



**UNIVERSIDAD DE VALPARAÍSO
FACULTAD DE MEDICINA
CARRERA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



**“Comparación de fibrosis,
apoptosis y autofagia en el
miocardio de ratas adultas Sprague
Dawley sanas y con diabetes
mellitus inducida por
estreptozotocina, a las 2, 4, 8 y 12
semanas post inyección.”**

**Seminario de Grado
presentado en conformidad a los requisitos para obtener
el Grado Académico de
“Licenciado en Tecnología Médica con mención en Morfofisiopatología y
citodiagnóstico”**

**Autoras
Rina Cortés Bernal.
Vania Peirano Báez.**

**Profesor guía: Sebastián San Martín, PhD
Profesor co-guía: Ivo Carrasco Wong, PhD**

Año: 2020

AGRADECIMIENTOS

Al concluir este trabajo de investigación y finalizar esta etapa quisiéramos agradecer a nuestras familias y amigos, quienes nos han acompañado durante este largo proceso. Además, extender los agradecimientos a nuestros profesores de tesis quienes nos han dado su apoyo desde el comienzo de esta travesía y a todas las personas que nos encontramos y nos ayudaron con un consejo en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad.

RESUMEN

Antecedentes: La diabetes mellitus (DM) es una patología en la que se genera hiperglucemia. Una de las complicaciones frecuentes de estos pacientes es la miocardiopatía diabética (MCD), donde el corazón es afectado por fenómenos como: fibrosis, muerte celular, hipertrofia del ventrículo izquierdo, acumulación de metabolitos, entre otros. Tanto el mecanismo de muerte celular por apoptosis como el de autofagia están presentes en la MCD, sin embargo, el tiempo en que estos marcadores de muerte se hacen evidentes y participan activamente en el desarrollo patológico no está claro. Por lo anterior, este estudio pretende comparar la marcación de fibrosis, apoptosis y autofagia en miocardio de ratas adultas Sprague Dawley en un modelo de diabetes experimental en un curso temporal.

Métodos: Esta investigación se enmarca en un proyecto previo, donde se utilizaron 40 corazones de ratas adultas macho de la cepa Sprague Dawley (20 controles y 20 diabéticas por STZ) a las que se pretendía aplicar un marcador inmunohistoquímico para apoptosis (caspasa-3-activada) y otro para autofagia (Beclin-1); además, de evidenciar el daño fibrótico mediante un Tricrómico de Masson. Debido a la emergencia sanitaria, se realizaron modificaciones para generar resultados simulados de los tres elementos mencionados, utilizando herramientas computacionales e investigaciones previas.

Resultados: Tanto el área de fibrosis como el de inmunomarcación de caspasa-3-activada fue mayor en ratas diabéticas que en los controles en cada uno de los cuatro tiempos, mientras que con el anticuerpo Beclin-1, se observó mayor inmunomarcación en los controles. Además, la intensidad de la inmunomarcación del anticuerpo para apoptosis fue significativamente mayor en los grupos diabéticos de la semana 8 y 12, mientras que, para el anticuerpo para autofagia, existió mayor intensidad en los controles que en los diabéticos en el mismo periodo de tiempo.

Conclusiones: Realizar un estudio en distintos tiempos permitió conocer que la fibrosis se mantiene como el componente con mayor evidencia reportada, además la apoptosis corresponde a un mecanismo fundamental en la progresión patológica, mientras que la autofagia podría tener un rol más importante de lo conocido, haciendo necesario realizar más investigaciones para una mayor comprensión.

PALABRAS CLAVES: Diabetes Mellitus - Miocardiopatía diabética - Fibrosis - Apoptosis - Autofagia - Caspasa 3 activada- Beclin 1.

ÍNDICE

1.1 CORAZÓN HUMANO	7
1.1.1 Descripción anatómica	7
1.1.2 Histología	9
1.2 DIABETES MELLITUS	13
1.2.1 Generalidades	13
1.2.2 Control de la glicemia: rol de la insulina	13
1.2.2 Formación de la Insulina	15
1.2.3 Epidemiología	16
1.2.4 Factores de riesgo	17
1.2.5 Diagnóstico y tratamiento	18
1.2.6 Complicaciones	19
1.2.7 Diabetes mellitus y patología cardiaca	20
1.3 MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA	20
1.3.1 Generalidades	20
1.3.2 Fisiopatología	21
1.3.2.1 Alteraciones del calcio	22
1.3.2.2 Lipotoxicidad y glucotoxicidad	22
1.3.2.3 Estrés oxidativo	23
1.3.2.4 Fibrosis miocárdica	25
1.3.2.5 Muerte celular	26
1.3.3 Diagnóstico y tratamiento	27
1.4 MUERTE CELULAR	27
1.4.1 Apoptosis	28
1.4.2 Autofagia	32
1.4.3 Muerte celular en patología cardiaca	35
1.5 PROYECCIONES	37
1.6 HIPÓTESIS	37
CAPÍTULO 2. OBJETIVOS	39
2.1 OBJETIVO GENERAL	39
2.1.2 Objetivos específicos	39
CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS	41
3.1 ANIMALES Y PROCESAMIENTO	41

3.2 SIMULACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL	43
3.3 SIMULACIÓN DE GLICEMIAS	44
3.4 TÉCNICA HISTOQUÍMICA	45
3.5 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA	47
3.6 GENERACIÓN DE DATOS	50
3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	53
4.1 GLICEMIAS	53
4.2 VISUALIZACIÓN DE TÉCNICAS	53
4.3 PORCENTAJE DEL ÁREA DE FIBROSIS	55
4.4 PORCENTAJE DEL ÁREA DE INMUNOMARCACIÓN DE APOPTOSIS	56
4.5 PORCENTAJE DEL ÁREA DE INMUNOMARCACIÓN PARA AUTOFAGIA	57
4.6 INTENSIDAD DE INMUNOMARCACIÓN PARA APOPTOSIS	58
4.7 INTENSIDAD DE INMUNOMARCACIÓN PARA AUTOFAGIA	59
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN	61
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	66
CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA	67
ANEXOS	74
ANEXO 1	74
ANEXO 2	75
ANEXO 3	77
ANEXO 4	79

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA1.1	7
FIGURA1.2	8
FIGURA1.3	10
FIGURA1.4	12
FIGURA1.5	13
FIGURA1.6	14
FIGURA1.7	16
FIGURA1.8	25
FIGURA1.9	30
FIGURA1.10	32
FIGURA1.11	33
FIGURA1.12	35
FIGURA 3 1	45
FIGURA 3. 2	47
FIGURA 3. 3	49
FIGURA 3. 4	50
FIGURA 3. 5	53
FIGURA 3. 6	54
FIGURA 3. 7	54
FIGURA 4. 1	57
FIGURA 4. 2	57
FIGURA 4. 3	58
FIGURA 4. 4	59
FIGURA 4. 5	60
FIGURA 4. 6	61
FIGURA 4. 7	62
FIGURA 4. 8	63

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 .1.	28
TABLA 3. 1.	43
TABLA 4 1	55

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

1.1 CORAZÓN HUMANO

1.1.1 Descripción anatómica

El corazón es un órgano muscular que se encuentra ubicado al interior de la cavidad torácica, por atrás y a la izquierda del esternón, en el mediastino medio, entre los pulmones (1). Su origen embrionario es mesodérmico, e inicia su formación entre el final de la cuarta e inicio de la quinta semana de desarrollo del embrión (2).

Este órgano, en su fase adulta, mide aproximadamente 12 cm de largo por 9 cm de ancho, donde se puede observar una base, conformada por las aurículas, y una punta o también llamado vértice, que reposa sobre el diafragma (1) tal como se observa en la Figura 1.1. En adultos pesa en promedio entre 230 a 370 gramos, siendo sus proporciones y peso afectados por factores como el índice de masa corporal, la edad y sexo, correspondiendo a un 0,45% del peso corporal en varones y 0,40% en mujeres (3).

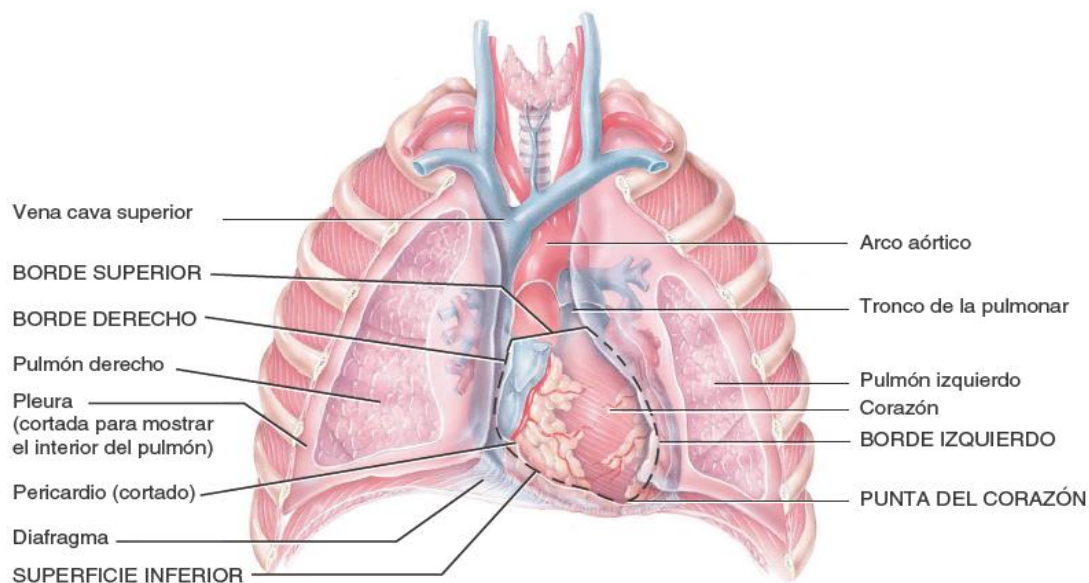


FIGURA 1.1: Vista anterior de la cavidad torácica donde se muestra la localización del corazón en relación a las estructuras que lo rodean en cada uno de sus bordes (4).

Anatómicamente, el corazón consta de cuatro cámaras o divisiones, éstas son: dos aurículas, una derecha (AD) y otra izquierda (AI) separadas por el tabique interauricular; y los ventrículos, derecho (VD) e izquierdo (VI) divididos por el tabique interventricular. Por lo tanto, cada hemicardio, o mitad de corazón tiene una aurícula y un ventrículo del lado correspondiente; la comunicación entre ellos es a través de válvulas: por la parte derecha la

válvula tricúspide (VT) y por la parte izquierda la válvula bicúspide (VB) o mitral (1). Considerando que el corazón tiene un papel fundamental como bomba del sistema circulatorio (5), la mitad derecha recibe sangre desoxigenada en su AD, la cual proviene de la extremidad superior del cuerpo a través de la vena cava superior, de la extremidad inferior por la vena cava inferior y el seno coronario (sangre del propio corazón). Esta sangre se dirige hacia el VD pasando a través de la VT y es bombeada hacia la arteria pulmonar pasando por la válvula pulmonar, la que permite derivarla a la circulación menor (pulmonar) donde debe oxigenarse. A su vez, la mitad izquierda a través de la AI recibe de vuelta esta sangre oxigenada a través de cuatro venas pulmonares, esta sangre luego de pasar por la VB, es bombeada por el VI pasando por la válvula aórtica hacia la arteria Aorta y así se distribuye hacia el resto del cuerpo; por lo tanto, es en este ventrículo donde se requiere ejercer una mayor presión, por ende, sus paredes son más gruesas (Figura 1.2). Cabe señalar que la función de cada válvula anteriormente mencionada es evitar el flujo retrógrado de la sangre (1).

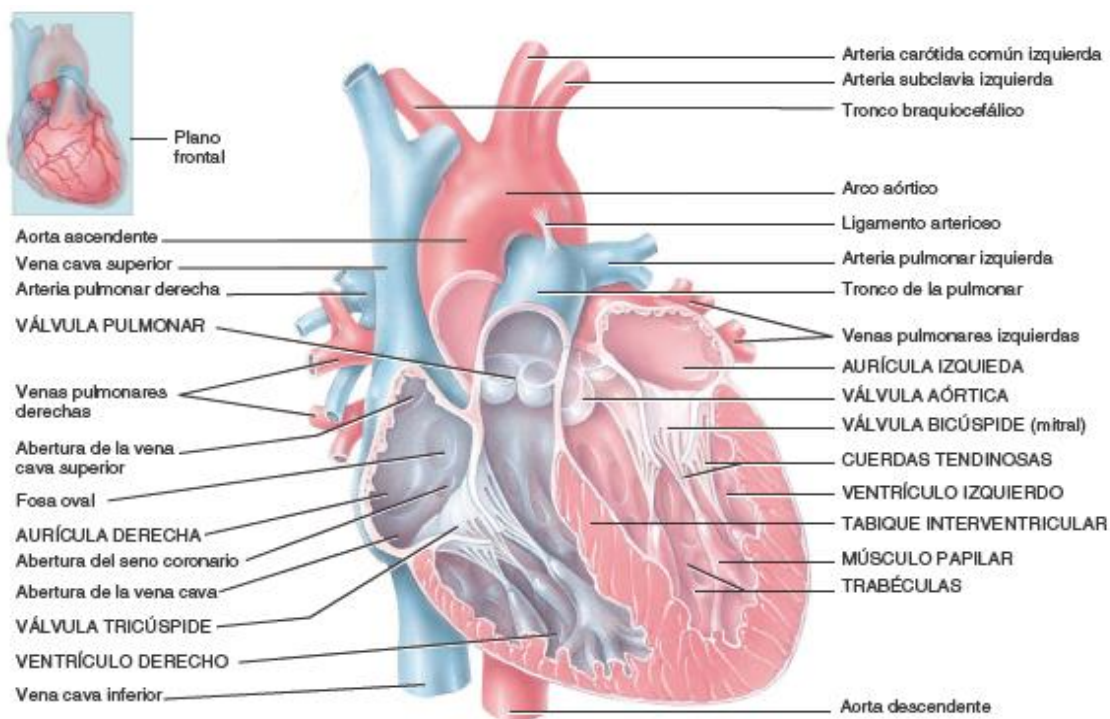


FIGURA 1.2: Estructura interna del corazón desde un plano frontal donde se indican los distintos elementos que conforman el órgano, destacándose las dos aurículas y ventrículos con sus válvulas correspondientes (4).

Tal como se ha mencionado anteriormente, la función principal de este órgano es realizar el bombeo de la sangre de manera constante a través del sistema circulatorio mediante la contracción y relajación muscular, aportando así la nutrición y el oxígeno requerido por los

diversos tejidos, además de la eliminación de desechos, como el dióxido de carbono. Para que este tejido realice el bombeo sanguíneo existe un sistema de vías eléctricas especializadas que tiene la finalidad de asegurar la rápida transmisión de impulsos eléctricos, lo que implica que es excitado para realizar la contracción y luego debe relajarse de manera coordinada: primero son excitadas las aurículas y luego los ventrículos asegurando de esta forma el paso de la sangre a través de las válvulas semilunares (1). Este sistema de conducción está controlado por el sistema nervioso autónomo, el cual controla la frecuencia de dichos impulsos. Está constituido por fibras musculares cardíacas modificadas, siendo los impulsos iniciales originados espontáneamente en el nódulo sinoauricular (NS) ubicado en la pared de la AD, próximo a la entrada de la vena cava superior (6).

En relación al suministro sanguíneo, se debe mencionar que este órgano recibe un 5% del total corporal, esto con la finalidad de mantener un aporte constante de nutrientes. La irrigación externa y del miocardio se realiza por las arterias coronarias, las cuales tienen su origen en la aorta y se divide en: la arteria coronaria derecha con la rama marginal hacia el ventrículo derecho y la arteria coronaria izquierda con la rama circunfleja que, en conjunto con la arteria descendente anterior y posterior, irrigan el ventrículo izquierdo, formando de esta manera una red de irrigación para el músculo cardíaco. Internamente el endocardio recibe sangre directamente de las cámaras cardíacas (1).

1.1.2 Histología

Estructuralmente se pueden reconocer diferentes capas en el corazón, estas se describen a continuación desde exterior a interior:

El pericardio corresponde a una membrana que rodea al corazón, se subdivide en pericardio fibroso hacia exterior, el cual corresponde a un tejido conjuntivo irregular denso, no elástico que tiene la finalidad de fijarlo en su ubicación; e interiormente en pericardio seroso con un pericardio parietal o capa externa fusionada al pericardio fibroso, y un pericardio visceral también conocido como epicardio, adherido a la superficie del corazón (1), ésta última capa histológicamente es delgada y formada por una densa lámina de tejido fibrocolágeno que también contiene fibras elásticas y en algunas áreas posee tejido adiposo (6). En su superficie externa existe una monocapa aplanada de células mesoteliales, las que tienen como función secretar una pequeña cantidad de líquido lubricante (6) que permite que entre las membranas no exista fricción durante los movimientos cardíacos (1).

El miocardio, es un tejido muscular exclusivo del corazón, se encuentra bajo el pericardio y corresponde a la mayor parte de este órgano (1). Dado a que su función se encuadra principalmente en la contracción y conducción de los impulsos eléctricos, es más prominente en el ventrículo izquierdo y más delgado tanto en las aurículas como en el ventrículo derecho (sometidos a menor presión de bombeo) (6). Está formado por células denominadas cardiomiocitos (Figura 1.3), que se mantienen juntas a las células adyacentes por sus extremos, mediante haces entrelazados de fibras, lo que se conoce como discos intercalares, éstos últimos corresponden a un engrosamiento del sarcolema (membrana citoplasmática) y presentan dos formas de unión: a través de desmosomas, cuya función es mantener unidos a los cardiomiocitos; y a través de uniones de hendidura, las que permiten el avance rápido del potencial de acción (1).

Finalmente, el endocardio, corresponde a la capa más interna y recubre el interior tanto del músculo cardiaco como de las válvulas (1). Esta capa corresponde a un epitelio plano simple de células endoteliales aplanadas (6).

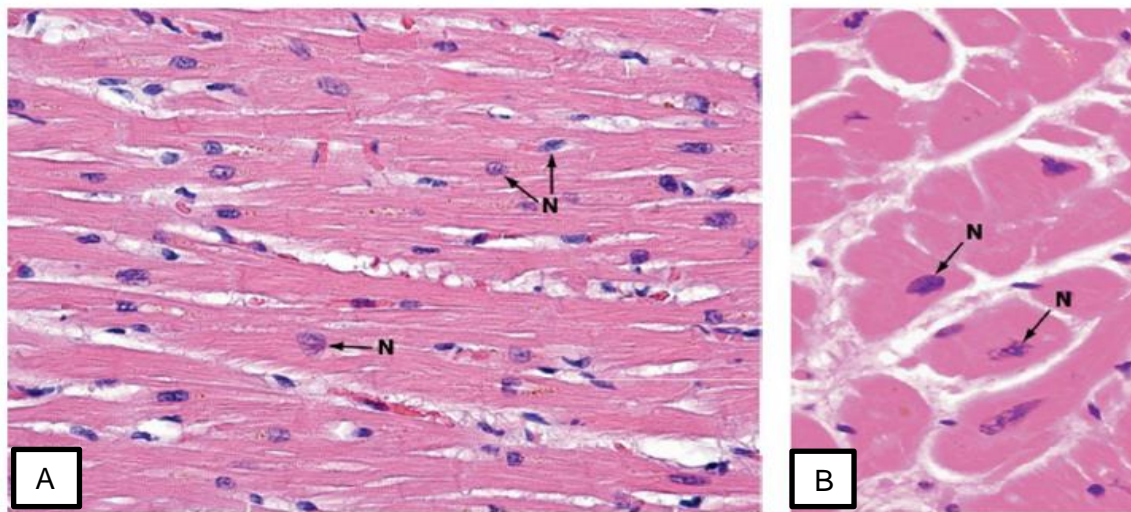


FIGURA 1.3: Corte histológico de corazón con tinción de rutina Hematoxilina y eosina (H-E). En A se muestra un corte longitudinal con aumento de 10X, con núcleos N de ubicación central, además de las ramificaciones típicas de la célula cardiaca. En B se muestra una visión transversal con un aumento de 40X. Modificado de (6).

A nivel histológico, como se ha mencionado anteriormente, el tejido cardiaco contiene células especializadas denominadas cardiomiocitos o también conocidos como miocardiocitos, los cuales tienen núcleo central y miofilamentos contráctiles intracelulares (5). Se describen en literatura como células largas y cilíndricas ramificadas (6) con una longitud que varía entre

85 a 100 μm y aproximadamente 15 μm de diámetro (5). En esta célula se puede observar uno o dos núcleos, estriaciones transversales y en su citoplasma, un gran número de mitocondrias, característica que hace que requiera un gran suministro de oxígeno y que, al ocurrir la reducción de éste, podría generar fatiga muscular (1,5).

Tal como se ha mencionado anteriormente, a través de los discos intercalares se produce la unión entre cardiomiocitos, estas uniones exclusivas de este tejido corresponden a complejos de unión termino-terminal especializadas en disposición escalonada, lo que significa que tiene componentes transversales y longitudinales (Figura 1.4). Estas últimas se encuentran paralelas a los miofilamentos del cardiomiocito, y es aquí donde se encuentran las uniones comunicantes que se destacan porque permiten tanto la comunicación iónica de las células como la sincronía de la contracción muscular (5).

Por otra parte, en el sarcolema de estas células se hallan proteínas transportadoras específicas que cumplen el rol de controlar tanto la liberación como la recaptación de iones para la contracción y relajación muscular. Uno de los principales elementos involucrados es el calcio, éste es transportado activamente hacia la luz del retículo sarcoplásmico, proceso que está mediado por una ATPasa dependiente de Ca^{+2} y controlada por una proteína de membrana denominada fosfolambán (5).

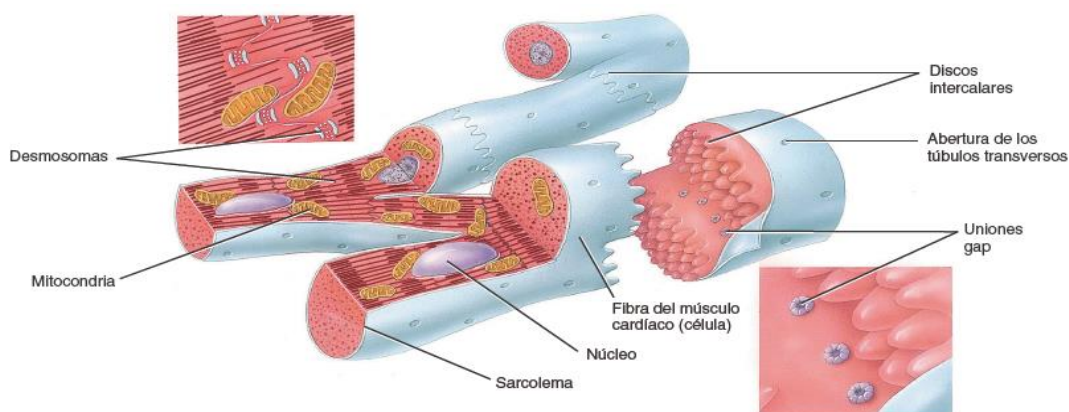


FIGURA 1.4: Representación de una fibra cardíaca donde se aprecia su estructura ramificada, esto es posible debido a los discos intercalares que permiten la unión entre las células, tal como se aprecia en el esquema. Además, se observan los principales componentes intracelulares de los cardiomiocitos (4).

Dado que las células miocárdicas presentan una elevada demanda energética, si se privan de oxígeno mueren sin ser sustituidas, lo que ocasionan los trastornos miocárdicos; por ejemplo, al ocurrir dicha disminución gradual en la oxigenación, la muerte de las cardiomiocitos es lenta, sin embargo, el paciente puede desarrollar una patología denominada angina de pecho, la cual se caracteriza por dolor opresivo frente a actividades de mayor esfuerzo, pero no en reposo. A medida que la isquemia aumenta la angina puede surgir incluso en reposo, y a nivel histológico las células que mueren son sustituidas por tejido conjuntivo denso mientras que en las sobrevivientes se desarrolla una hipertrofia compensatoria. Por otra parte, cuando ocurre una disminución de sangre arterial al corazón debido a una oclusión del lumen se conoce como aterosclerosis, ésta es una enfermedad arterial en que la reducción completa de la luz genera la muerte de parte importante de la masa cardíaca de manera súbita, dificultando a la vez la contracción del corazón y generando una insuficiencia cardíaca, lo que en caso de ocurrir en una arteria coronaria se conoce como infarto al miocardio (6). Por lo tanto, cuando el tejido sufre de isquemia, se desarrollan procesos de muerte celular (5).

Finalmente, en el plano investigativo y el uso de modelos experimentales con animales, siendo de uso más frecuente las ratas y ratones, es importante mencionar que la anatomía de su corazón tiene algunas particularidades, por ejemplo: su forma es más ovoide y el pericardio más delicado, además presenta solo un orificio de entrada para las venas pulmonares en comparación a los cuatro presentes en el humano (uno para cada vena) (Figura 1.5) ; a su vez, las arterias coronarias llegan a la profundidad de la pared del corazón mientras que en el humano lo hace en la superficie. A nivel histológico no presenta diferencias importantes (7).

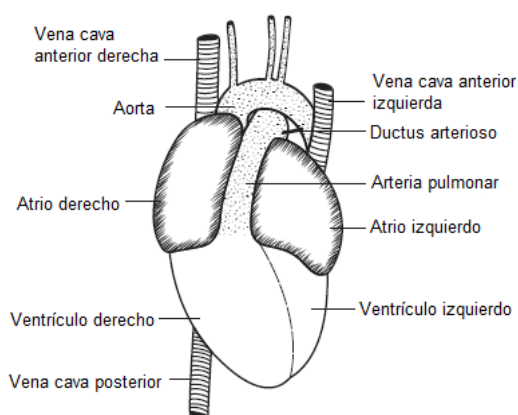


Figura 7.3 Corazón (vista ventral)

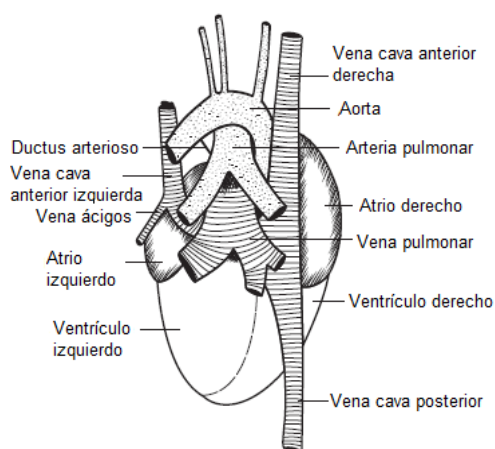


Figura 7.4 Corazón (vista dorsal)

FIGURA 1.5: Esquema anatómico del corazón de una ratita desde una perspectiva anterior y posterior, de izquierda a derecha respectivamente (7).

1.2 DIABETES MELLITUS

1.2.1 Generalidades

Se denomina diabetes mellitus a un conjunto de alteraciones metabólicas que comparten la hiperglucemia como característica principal, la cual se genera por la falta de insulina, defectos en su acción o ambas (8,9). El término diabetes lo otorga el médico griego Areteo de Capadocia, haciendo alusión al gran volumen de orina emitida por estos pacientes en quienes la carne se convertía en orina, según sus apreciaciones. Posteriormente y con el pasar de las décadas, con distintas descripciones y con síntomas similares observados por distintos científicos, en 1679 Tomás Willis la denomina como diabetes mellitus haciendo referencia al dulzor característico de la orina similar a la de la miel (10,11).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) junto al Grupo Nacional de Datos sobre Diabetes perteneciente a Estados Unidos, clasificó las distintas formas de diabetes mellitus según su etiología (12), de esta forma se distinguen 4 grupos:

1. Diabetes tipo 1 o insulino dependiente: donde se destruyen las células beta del páncreas generando la deficiencia de la producción de la hormona insulina, pudiendo ser de carácter autoinmune o idiopática.
2. Diabetes tipo 2: se produce por una combinación entre la resistencia de los tejidos a la acción de la insulina y una deficiente secreción de ésta.
3. Diabetes gestacional: será cualquier intolerancia a la glucosa que se desarrolle durante el embarazo.
4. Otros tipos específicos: como defectos genéticos de la insulina, endocrinopatías, infecciones, diabetes inducida por fármacos, entre otros (12).

1.2.2 Control de la glicemia: rol de la insulina

El control de los niveles de glucosa en la sangre es tarea realizada principalmente por el páncreas. Este órgano tiene dos porciones: una exocrina correspondiente a los acinos encargados de secretar jugos digestivos al duodeno, y una endocrina formada por los Islotes

de Langerhans, los que, a su vez, contienen células alfa encargadas de la secreción de glucagón, células beta para la secreción de insulina y amilina, células delta para la somatostatina y células PP que liberan el polipéptido pancreático (9) (Figura 1.6).

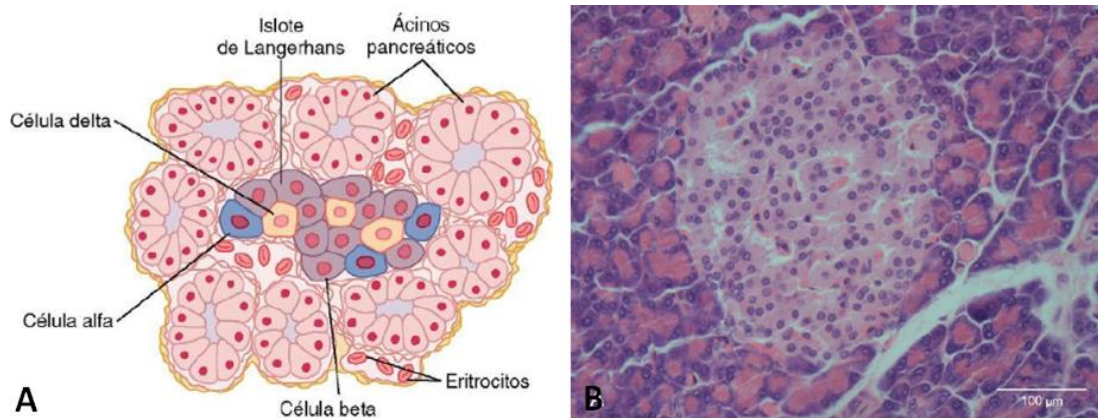


FIGURA 1.6: En **A** se muestra un dibujo esquemático de una pequeña porción del páncreas, mientras que **B** corresponde a lo que se observa realmente con tinción de hematoxilina-eosina utilizando un microscopio óptico. En ambos casos en el centro se identifica un islote de Langerhans con las diferentes células que lo conforman y a su alrededor se aprecian varios acinos pancreáticos. Modificado de (9) (13).

La insulina es la hormona más determinante en la disminución de la glucosa en sangre y sus funciones se pueden resumir en: a) promover la captación de glucosa y su almacenamiento como glucógeno, b) prevenir la degradación de grasas y glucógeno, c) inhibir la gluconeogénesis además de promover la síntesis proteica (14). En condiciones fisiológicas, tras la ingesta de alimento se estimula la secreción de insulina, la cual se une a su receptor en la célula blanco desencadenando la translocación de transportadores específicos conocidos como *transportador de glucosa* (GluT) (4) los que se encuentran en la superficie celular, permitiendo la captación de la glucosa (15); además, también existen cotransportadores de sodio y glucosa que cumplen la misma función (16). De esta manera cada célula del organismo puede realizar sus actividades vitales mediante la captación de glucosa para la síntesis de ATP como fuente de energía (4).

La familia de los GLUTS es amplia, sin embargo, se pueden agrupar en tres subfamilias según compartan características como el lugar de expresión de cada transportador y su afinidad por la glucosa. Uno de estos transportadores es el GLUT-2 que es de baja afinidad y es expresado en las células beta de los islotes de Langerhans en el páncreas, como también a nivel intestinal, renal y hepático; a su vez, el transportador GLUT-4 es expresado en el tejido muscular

cardíaco, tejido muscular estriado y adipocitos, presentando una gran movilidad y afinidad para el transporte de la glucosa (16).

En periodos de ayuno e inanición los niveles de insulina disminuyen, por lo que la obtención de energía se obtiene a partir de sustratos no glucídicos (15), siendo la gluconeogénesis desarrollada en el hígado una de las vías para mantener los niveles de glicemia en periodos de ayunos. En patologías metabólicas tales como la diabetes, obesidad y el síndrome metabólico, se evidencian alteraciones en los niveles de gluconeogénesis con la consecuente elevación de glucosa sanguínea (17,18), incluso en personas con DM2 se ha relacionado el exceso de gluconeogénesis a nivel hepático con el daño en órganos por el incremento de la hiperglicemia (19).

1.2.2 Formación de la Insulina

Como se mencionó anteriormente, la insulina se sintetiza en las células beta del páncreas, las cuales representan casi el 60% de las células de los islotes, ubicándose principalmente en el centro de ellos. Esta hormona se genera a partir de una preproinsulina que se desdobla en el retículo endoplasmático formando la proinsulina, la cual presenta una estructura de tres cadenas de péptidos; A, B y C (9).

La mayoría de esta proinsulina se mantiene en el aparato de Golgi en donde se escinde la cadena C para formarse en insulina como tal, la cual está conformada por la cadena A y B conectadas por uniones disulfuro. Tanto la insulina como el péptido C se empaquetan en los gránulos de secreción en partes iguales (Figura 1.7). Cuando la insulina se une al receptor de membrana de la célula efectora es capaz de iniciar sus efectos, por ende, es el receptor activado el que desencadena las acciones (9).

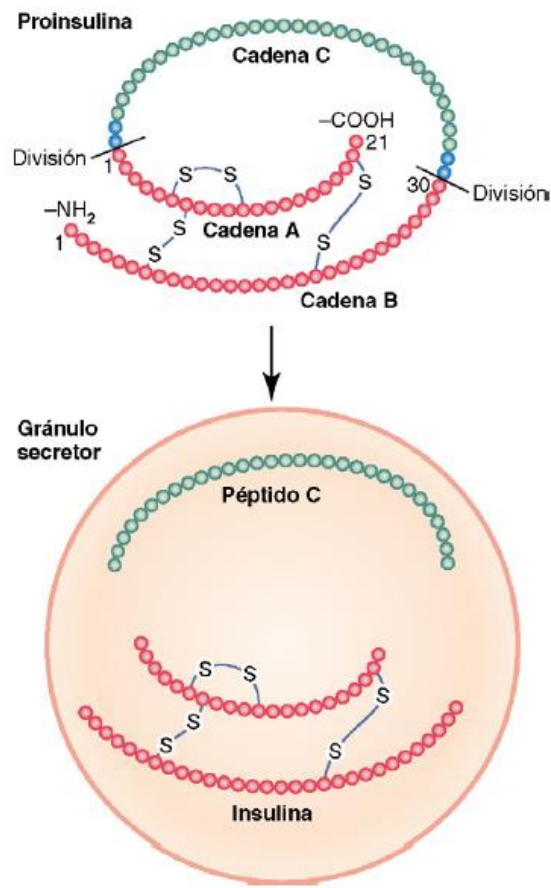


FIGURA 1.7: Esquema representativo de la molécula insulina que se escinde en el aparato de Golgi, en que se reconocen la cadena A seguida de la cadena C y luego la B, siendo esta cadena C intermedia la cual se elimina para la formación de la insulina como tal. El gránulo secretor contiene en su interior tanto péptido C como insulina, además de una pequeña cantidad de proinsulina (9).

1.2.3 Epidemiología

A nivel mundial, en el año 2000 se contabilizaron 150 millones de diabéticos, para el 2011 se estimaron 366 millones e incluso para el 2030 la cifra se estima en 552 millones, siendo distinto el incremento para los países desarrollados con un 42% y los países en vía de desarrollo con un 170%. Este aumento será transversal para los distintos grupos etarios, siendo del 91% para aquellas personas de 20 a 44 años, de un 215% para los de 45 a 64 años y de 234% para aquellos de mayor edad (20). Por otra parte, la Federación Internacional de Diabetes (IDF) determinó que en el año 2019 existían alrededor de 500 millones de personas con diabetes mellitus, cifra que se incrementará en un 51% para el año 2045 (21).

De forma más específica se conoce que entre el 5-10% de los afectados por diabetes mellitus son de tipo 1 siendo, principalmente, menores de 20 años, mientras que cerca del 90% lo son por la diabetes tipo 2 (8,22). Además, son los hispanos, afroamericanos y nativos norteamericanos los que presentan 1,5 a 2 veces más de probabilidad de sufrir diabetes en comparación a los blancos no hispanos (8).

En el plano nacional, según la tercera Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017, la prevalencia de sospecha de DM de la población chilena es del 12,3 %, aumentando 3,6 puntos porcentuales en comparación a la ENS 2009-2010 (23). Además, la prevalencia nacional es mayor en mujeres con un 14%, que en los hombres que presentan un 10,6%. Por otra parte, son los adultos de 65 años o más los que concentran el mayor porcentaje de sospecha de diabetes (medición de glicemia en ayuno mayor o igual a 126 mg/dl) con un 30,6%, seguido por los de 45 a 64 años que presentan un 18,3% y las personas de 15 a 24 años con 1,8% (24).

En la actualidad casi el 50% de los pacientes diabéticos no han sido diagnosticados (12) y la OMS estableció que la diabetes será la séptima causa de muerte en el año 2030 (25).

1.2.4 Factores de riesgo

En cuanto a los factores desencadenantes y que acentúan la patología, se destacan:

Antecedentes familiares: se ha establecido que la probabilidad de padecer diabetes tipo 2 por parte de la descendencia, aumenta en 3.5 veces si uno de los padres biológicos es diabético y 6.0 veces si ambos padres lo son (26).

Edad: la edad avanzada es uno de los factores de riesgo de esta patología, sin embargo, en el último tiempo los adultos entre 30 a 39 años con diabetes mellitus tipo 2 han aumentado en un 70% (26).

Etnia: tanto los hispanicos como los afrocaribeños presentan una prevalencia más alta de diabetes que las personas caucásicas (27).

Diabetes gestacional: aquellas mujeres que lo padecen tienen un alto riesgo de desarrollar diabetes mellitus al igual que sus hijos (28).

Sobrepeso y obesidad: ambos son factores de riesgos que incrementan su posibilidad a la par con el incremento del peso (29), siendo la obesidad abdominal aún más determinante en el

desarrollo diabético acelerando la edad diagnóstica (26). Cerca del 80% de los diabéticos están asociados a la obesidad, la cual favorece la resistencia a la insulina, mientras que aquellas personas con índice de masa corporal (IMC) $>35 \text{ kg/m}^2$ incrementan su riesgo relativo acorde a su edad en 6.1 veces más que aquellos con $\text{IMC} < 22 \text{ kg/m}^2$ (27). Este uno de los factores de riesgos más determinantes ya que un número no menor de la población presenta un grado de sobrepeso (28).

Sedentarismo: el estilo de vida sedentario reduce el gasto energético por lo que favorecen al sobrepeso y la obesidad (27), además el ejercicio físico incrementa la sensibilidad de la insulina y la tolerancia a la glucosa (28).

Trastornos de regulación de la glucosa: como la glucemia basal alterada (GBA) y la intolerancia a la glucosa (ITG), ambas se categorizan como prediabetes (27), si bien no todos con GBA o ITG desarrollan la patología, mientras más factores de riesgos cumplan, mayor será el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 (29).

1.2.5 Diagnóstico y tratamiento

La diabetes mellitus se presenta, en primer lugar, con hiperglucemia, y se puede acompañar de polidipsia, poliuria, polifagia, visión borrosa y pérdida de peso (12), sin embargo, la ADA establece que el diagnóstico de diabetes se realiza utilizando uno de los siguientes cuatro criterios:

- 1.- Glicemia basal en ayuna de ocho horas $\geq 126 \text{ mg/dL}$
- 2.- Glicemia $\geq 200 \text{ mg/dl}$ luego de dos horas de una prueba de tolerancia oral de 75 gramos de glucosa
- 3.- Hemoglobina glicosilada (HbA1c) $\geq 6,5\%$
- 4.- Glicemia al azar $\geq 200 \text{ mg/dl}$ junto a signos clásicos de hiperglucemia o crisis hiperglucémica

Para las tres primeras pruebas, si la hiperglucemia no es clara, se necesita repetir el test para asegurar el diagnóstico, mientras que en la cuarta no es necesaria una repetición (30).

El tratamiento de la diabetes mellitus conlleva modificaciones de los estilos de vida tanto de ejercicio físico como de un control nutricional ajustado al perfil del paciente en relación al sobrepeso, perfil lipídico, factores de riesgo cardiovasculares, elementos socioculturales, entre otros (22). En la diabetes mellitus de tipo 1, el tratamiento principal consta de varias dosis de insulina junto a un estilo de vida saludable, acorde a mantener el control metabólico y prevenir complicaciones crónicas (31). Por otra parte, en el tratamiento farmacológico en la diabetes tipo 2 se debe mencionar que pueden administrarse en monoterapia o en conjunto, siendo la primera línea la administración de metformina cuya acción se basa en disminuir la producción de glucosa hepática y aumentar la captación de glucosa en los músculos. Cuando la metformina es contraindicada, se procede a administrar fármacos sulfonilureas los cuales estimulan la secreción de insulina por parte del páncreas. Del mismo modo, también se pueden administrar fármacos como las meglitinidas, inhibidores de las α -glucosidasas, glitazonas, entre otros (22,32).

1.2.6 Complicaciones

Considerando que es una afección metabólica, son variadas las complicaciones que genera esta patología con el paso del tiempo. Es característico el engrosamiento difuso de las membranas basales lo que permite el desarrollo de retinopatía, cataratas, glaucoma y nefropatías con posible falla renal (31). Además se producen complicaciones de carácter gastrointestinales donde se puede observar que a nivel esofágico es más frecuente encontrar reflujo gastroesofágico, en el estómago se genera gastroparesia diabética en donde el 50-60% se presenta con vaciamiento gástrico retrasado, en etapas más avanzadas de la diabetes puede aparecer enteropatía diabética donde cerca del 22% presenta diarrea y 60% estreñimiento o incontinencia fecal principalmente nocturna, incluso en el hígado se favorece la acumulación de lípidos generando esteatosis hepática no grave (33). A su vez es posible observar problemas genitourinarios y de disfunción sexual (31), como lo son: vejiga hiperactiva, mal control de esfínter, retención urinaria e infecciones del tracto urinario, disfunción eréctil y disfunción sexual femenina (33).

Sumado a lo anterior, en esta patología es característico el desarrollo de daño macrovascular con una disfunción endotelial que predispone a la aterosclerosis, siendo el infarto al miocardio por aterosclerosis coronaria la principal causa de muerte en diabéticos. Además, en estos pacientes es frecuente el desarrollo de gangrena con amputaciones de extremidades inferiores producto de la vasculopatía avanzada (8).

1.2.7 Diabetes mellitus y patología cardíaca

Dentro de los problemas que enfrenta la salud pública a nivel mundial se encuentra el alto costo y altas tasas de morbimortalidad generados tanto por la DM, como por las enfermedades cardiovasculares (34).

En el contexto de los pacientes diabéticos, estas complicaciones cardíacas pueden presentarse como: enfermedad coronaria, correspondiente a la complicación macrovascular más clásica; insuficiencia cardíaca principalmente en etapas avanzadas de cardiopatías; miocardiopatía diabética evidenciable por la disfunción ventricular diastólica, sistólica o mixta y la presencia de fibrosis intersticial e hipertrofia; y neuropatía cardiovascular autonómica (33). Además, la cardiopatía isquémica sucede entre el 7,5- 20% de los diabéticos mayores de 45 años, dos tercios de estos tienen hipertensión y tienen de dos a cuatro veces más probabilidades de padecer un accidente cerebrovascular (20). También se debe considerar que la diabetes mellitus es uno de los factores de riesgo de la enfermedad coronaria y los accidentes isquémicos (35) siendo las complicaciones cardíacas predictores de morbilidad y mortalidad (36,37).

En los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1) es recurrente el inicio de cardiopatías en la tercera o cuarta década de vida; mientras que en la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) entre la quinta y sexta década, donde además se ha comprobado que presentan un riesgo de cardiopatía de dos a cuatro veces mayor en comparación a personas no diabéticas; por otra parte, las mujeres diabéticas presentan un índice de mortalidad por enfermedad coronaria cinco veces mayor en frecuencia en comparación con los hombres, por lo que es importante actuar en la prevención primaria de los factores de riesgo cardiovasculares (FRCV) (38).

1.3 MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA

1.3.1 Generalidades

El primer indicio de disfunción miocárdica relacionada a pacientes diabéticos ocurre en 1954 (39), sin embargo el término de miocardiopatía diabética surge en 1972 (40,41,42) gracias al estudio postmortem de 4 pacientes diabéticos quienes presentaron síntomas de falla cardíaca sin evidencia de hipertensión, daño coronario u otro (39,40,43), sin embargo, es en el año 2013 cuando el Colegio Estadounidense de cardiología (CAC), la Asociación americana del

corazón (AHA), la Sociedad Europea de cardiología (ESC) y la asociación Europea del estudio de diabetes (EFSD) la definen por primera vez como una condición clínica de los pacientes diabéticos, caracterizada por disfunción ventricular sin evidencia de aterosclerosis coronaria e hipertensión (43) aunque pueden coexistir (44). En el inicio se estimaba una prevalencia de 12% (44), sin embargo, al ser en primera instancia de carácter subclínico y asintomático, actualmente algunos estudios estiman una variación de 30 a 60% en pacientes con DM2 bien controlados (42).

Esta patología es encontrada tanto en pacientes con DM de tipo 1, como en el tipo 2 (44) (45), y se caracteriza por la acumulación lipídica en cardiomiocitos e hipertrofia ventricular izquierda (HVI) causantes de disfunción contráctil (40,41), ocasionando rigidez, por el aumento de fibrosis miocárdica y alteraciones vasculares (42,46). A nivel celular los hallazgos estarían relacionados con la disminución del transporte de calcio extracelular (vinculado a la disfunción cardíaca) y en la acumulación intracelular de metabolitos generados por la oxidación de ácidos grasos (46).

En condiciones normales el corazón en reposo consume entre $\frac{1}{3}$ y $\frac{2}{3}$ de ácidos grasos libres (41) y en actividades físicas carbohidratos, ambos con la finalidad de generar ATP y oxígeno, lo que se conoce como flexibilidad metabólica (44). Cuando ocurre una baja de glucosa se desencadena, a modo de compensación, la utilización de lípidos y cuerpos cetónicos para la producción energética requerida (46); sin embargo, en la DM el equilibrio energético se pierde, siendo afectadas áreas relacionadas con el receptor GLUT-4 y un exceso de ácidos grasos (41,42) desencadenando que el miocardio no puede usar eficientemente los sustratos y en consecuencia se produzca la incompleta oxidación de ácidos grasos, produciendo aldehídos y especies reactivas de oxígeno (ERO), que en altos niveles resultan tóxicos (44). También se plantean cambios en la homeostasis del calcio (42), falla en receptores como el receptor de Rianodina también relacionado al calcio; procesos vinculados a un incremento de la hormona antidiurética (ADH); neuropatías en el sistema autónomo cardíaco (41), esto es, en la denervación y aumento de catecolaminas (42); y fallas en la estructura a nivel cardíaco (41,42).

1.3.2 Fisiopatología

Aún se encuentran en estudio los procesos fisiopatológicos que desencadenan esta patología, algunos autores describen que son varios los mecanismos que podrían explicar este desorden, a continuación, se describen algunos de los procesos mencionados anteriormente:

1.3.2.1 Alteraciones del calcio

El calcio juega un papel importante en la fisiología cardíaca: durante el potencial de acción se produce la despolarización de la membrana del cardiomiocito permitiendo el ingreso de este elemento, esto genera la liberación de iones de calcio por parte del retículo sarcoplásmico (RS) mediante el receptor de rianodina, de esta forma el calcio intracelular puede unirse a los miofilamentos e iniciar la contracción, para luego, durante la relajación, ser eliminados del citosol hacia el retículo sarcoplásmico o al medio extracelular (43,47). En la cardiopatía diabética se ha observado la falla de los transportadores de calcio (47,48) lo que aumenta la duración del potencial de acción y por consiguiente el tiempo de relajación diastólica (43), en la sobrecarga de este elemento se altera la permeabilidad mitocondrial y conduce a la apoptosis celular (49). También se ha observado que, en los pacientes diabéticos, como consecuencia de los desórdenes metabólicos y el estrés oxidativo, presentan mayor sensibilidad al calcio por parte del poro de transición mitocondrial lo que permite procesos de autofagia y necrosis de los cardiomiocitos (48).

A su vez, la resistencia de insulina y la hiperglicemia crónica afectan a nivel del RS, mitocondrias y en consecuencia los niveles del calcio presente a nivel intracelular (49), lo que interfiere potenciando la liberación espontánea de calcio por parte del RS afectando negativamente el movimiento del mismo fuera del citoplasma ayudando así a la prolongación del potencial de acción (48).

En relación al receptor de rianodina, se ha descrito que en pacientes diabéticos y con IC está disminuido, esto afecta la liberación de calcio sarcoplásmico y por ende baja la contractibilidad del cardiomiocito (41), disfunciones de este receptor también se han asociado a hipertrofia cardíaca y daño en isquemia-reperfusión (45).

1.3.2.2 Lipotoxicidad y glucotoxicidad

En un organismo sano, los cardiomiocitos pueden obtener glucosa con la acción de la insulina, sin embargo, en la DM2 se desarrolla resistencia a esta hormona, incrementando los niveles de glucosa y lípidos (44). El aumento de los productos generados por oxidación de ácidos grasos, tóxicos en el miocardio, son en su mayoría ceramidas y diacilglicerol (39) (49) el primero se vincula a la translocación del receptor GLUT-4 y el consumo de glucosa; mientras que el segundo, afecta el metabolismo de la glucosa en miocitos, donde disminuye la señalización de insulina y además afecta la producción de óxido nítrico (49,51).

La acumulación de los triglicéridos en esta patología ha sido estudiada con distintos modelos de DM y se conoce como lipotoxicidad, además estudios indican que podría relacionarse con la inducción de muerte celular en los cardiomiocitos y disfunción mitocondrial (39).

Por otra parte, se genera glucotoxicidad cuando se produce el cambio de producción energética en el miocardio mediante la utilización de la beta oxidación de los ácidos grasos. Cuando ocurre la disminución en el consumo de glucosa, se acumulan intermediarios, éstos a su vez pueden relacionarse con otras vías que no generan ATP donde se encuentran: la vía de poliol asociada a ERO; vía hexosamina vinculada a alteración del metabolismo del calcio y la vía de gliceraldehído-3-fosfato que genera aumento de proteína kinasa C (PKC) y eleva el nivel de metilglioxal y de AGES (productos finales de la glicosilación avanzada o del inglés Advanced Glycosylation End products) (49). Este incremento podría estar directamente relacionado con el daño miocárdico dado a la unión con sus receptores (RAGE) y, en consecuencia, un incremento de procesos fibróticos por la activación de la cascada inflamatoria desencadenada por el aumento de citocinas y factores de crecimiento (42).

1.3.2.3 Estrés oxidativo

Como se ha mencionado anteriormente, esta patología tiene la característica de generar disfunción ventricular izquierda, la cual puede ser diastólica, sistólica o mixta (41,42,52). En estos casos, es frecuente el hallazgo en el incremento tanto de masa como de grosor de la pared del ventrículo, siendo claves en la demostración de disfunción cardíaca (52). La disfunción cardíaca a su vez, está implicada en la generación de estrés oxidativo, el cual se incrementa y no logra ser controlado por los sistemas antioxidantes endógenos, por lo que, al ser persistente en el tiempo, el daño ocasionado por ERO conlleva a inflamación y procesos fibróticos en el miocardio (44). Se ha descrito que en la DM los principales mecanismos de aumento de ERO se deben a la hiperglucemia, el incremento de ácidos grasos y la oxidación de éstos vinculados a un daño mitocondrial (41). En la patología, las mitocondrias al interior de los cardiomiocitos son afectadas por la acumulación de lípidos ocasionando una mayor demanda de oxígeno, este elemento a su vez, favorece aún más la generación de ERO y por ende en el estrés oxidativo, aumentando la permeabilidad de membrana de la mitocondria externa inductora de apoptosis (Figura 1.8) (49). El medio metabólico en el que se encuentran involucrados los procesos anteriores también afectan los niveles de ácidos grasos circulantes y triglicéridos, aumentándolos; en la alteración de vías de señalización a cardiomiocitos, entre ellas la disfunción mitocondrial, y la alteración de procesos homeostáticos como autofagia y

apoptosis (44), esta última elevada por un incremento de citoquinas inflamatorias y especies reactivas de óxido nítrico relacionado también con el proceso necrótico (51).

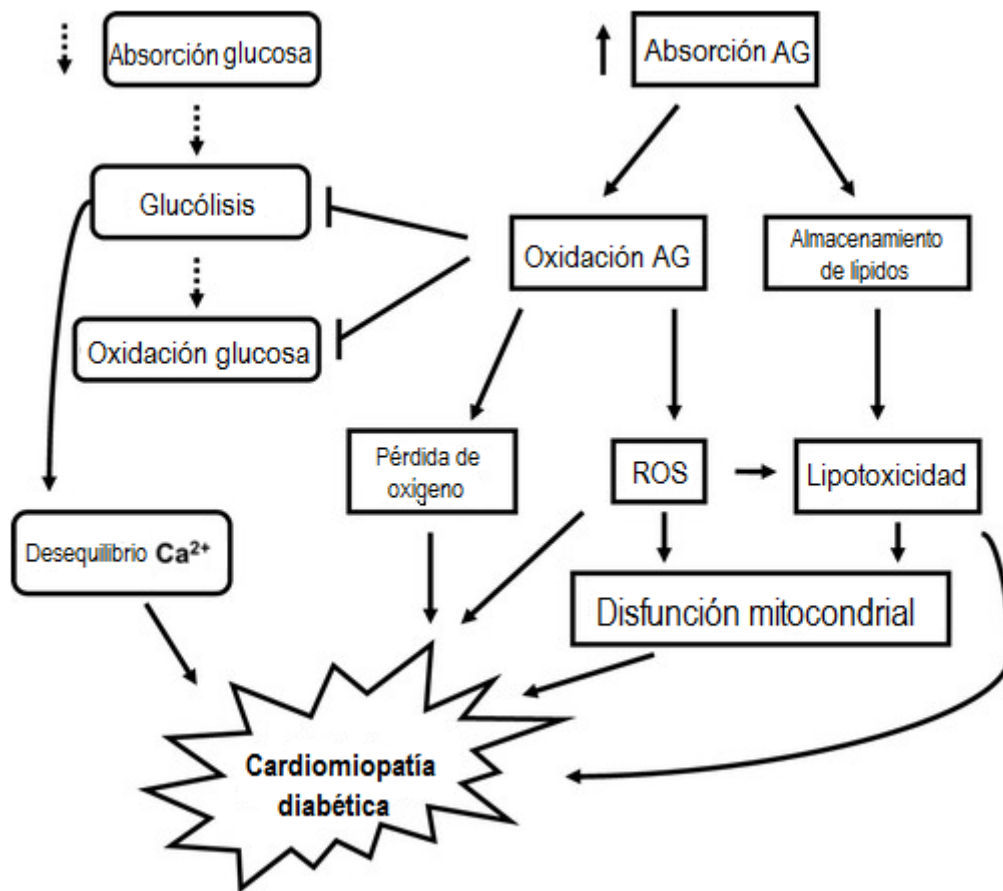


FIGURA 1. 8: Esquema que representa a los factores metabólicos que contribuyen al desarrollo de la miocardiopatía diabética. La disminución de la oxidación de glucosa y a su vez el aumento de ácidos grasos incrementa ERO, lipotoxicidad y disfunción mitocondrial. Modificado de (53).

A nivel metabólico, una de las hipótesis para el incremento de ERO se basa en la hiperglicemia vinculada a una elevación de glucosa en la vía de poliol, convirtiendo NADPH en NADP eliminando Glutatión, uno de los principales elementos del sistema antioxidante (41,49), por lo que, tanto la elevación de glucosa como de lípidos genera un aumento de ERO, lo que a su vez desencadena disfunciones con el transporte de calcio, alteración en la función mitocondrial (44), muerte celular, hipertrofia de miocitos y generación de fibrosis intersticial (aumentando los depósitos de colágeno en el miocardio) (49) en el que el daño miocárdico además generaría apoptosis y la disfunción ventricular (44).

A nivel del núcleo celular, se encuentran receptores que promueven la utilización de ácidos grasos libres mediante transcripción de genes que codifican proteínas, como es el caso del receptor PPAR-alfa (receptor alfa activado proliferador de peroxisoma). En pacientes con DM se incrementa este receptor, el cual se activa cuando los niveles de ácidos grasos son lipotóxicos (41) y disminuye los niveles de captación de calcio por el retículo sarcoplásmico. A su vez, las proteínas de la matriz extracelular pueden aumentar en cantidad por la respuesta inflamatoria generada por la unión de AGES a receptores de la superficie celular (41,49).

La flexibilidad metabólica característica del corazón también se ve comprometida con la producción de EROS. En condiciones normales la fosforilación oxidativa mitocondrial produce cerca del 95% del ATP cardiaco, sin embargo durante la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y el aumento de los triglicéridos afectan la utilización de glucosa como fuente energética (43), por lo que el aumento de la oxidación de los ácidos grasos y la ineficiente flexibilidad metabólica del corazón diabético genera un desequilibrio entre el uso y la generación de ATP (48) y por consiguiente existe una fosforilación oxidativa dañada acompañada del incremento de EROs por parte de las mitocondrias (43,48) además de la liberación de protones mitocondriales que aumentan aún más la producción de EROs (43).

1.3.2.4 Fibrosis miocárdica

La fibrosis intersticial surge del crecimiento desproporcionado del tejido conjuntivo presente a nivel cardíaco, esto es, fibroblastos que sintetizan colágeno y matriz extracelular de forma exacerbada (52), además, también se presentan alteraciones en la degradación del colágeno relacionadas con la disminución de la metaloproteinasa de matriz tipo 2 (MMP-2) (51). Esta última, también es conocida como gelatinasa A, la cual es secretada por fibroblastos y se vincula con la actividad enzimática en la destrucción de componentes como membranas basales, elastina, colágeno tipo IV, V, VII y X (54).

Cabe señalar que en la hiperglicemia las células endoteliales inducen la fisión mitocondrial, proceso vinculado a la apoptosis y además eleva el nivel de PKC presente en los fibroblastos lo que deriva a un aumento tanto en cantidad como en almacenamiento del colágeno (39). En conjunto con lo anterior, se describe la aparición de material PAS-positivo y el incremento en la concentración de triglicéridos y colesterol (52).

También, durante el estado de hiperglicemia, aumentan la acumulación de las AGE's, lo que tiene como consecuencia una mayor oxidación de lípidos y proteínas, aumento de la

producción de colágeno y fibronectina e incremento del tejido conectivo y fibrosis (43), incluso estas AGE's producen más EROs y factor transformador de crecimiento beta, por lo que se produce en aún más tejido conectivo y fibrosis miocárdica (49). Al progresar la patología, estos elementos se depositan en el miocardio en células endoteliales y paredes arteriales, siendo su distribución intersticial y perivascular (49,51). Las AGE's también se relacionan con el daño generado a nivel vascular, neurológico, inmunológico entre otros, tanto en la DM como en el envejecimiento como tal (55). Por otra parte, el tipo de colágeno que prevalece en el epicardio y en la región perivascular es de tipo I y III respectivamente, esto es lo que conlleva a una rigidez del miocardio dificultando la relajación del corazón y originando una disfunción diastólica (49).

1.3.2.5 Muerte celular

Los mecanismos moleculares que se afectan en la DM alteran la homeostasis de diferentes vías, como los de apoptosis y autofagia (44). La muerte de los cardiomiocitos se ha relacionado con la acumulación de ácidos grasos libres en el cardiomiocito, produciendo la lipotoxicidad característica en el desarrollo de la patología, la cual genera la disminución de la autofagia fisiológica de los miocitos e incrementa la apoptosis (48), además tanto el estrés que se genera en el RS junto con la existencia de proteínas mal plegadas inhiben la síntesis de proteínas nuevas y la degradación de las dañadas, por lo que también incentivan la apoptosis y autofagia (43). Por otra parte, el estrés oxidativo también se ha relacionado en la aceleración de la apoptosis al participar en la glicosilación y fosforilación de la proteína p53 (45).

Las alteraciones funcionales del cardiomiocito como consecuencia de la apoptosis se relacionan principalmente con la dinámica mitocondrial y la disfunción contráctil del miocardio (49). Este mecanismo de muerte celular puede causar la pérdida del tejido contráctil, generar hipertrofia y fibrosis compensatoria (56). Por otra parte, en el estudio de las cardiomiopatías, se ha observado que el proceso de autofagia es fundamental para evitar la acumulación de proteínas mal plegadas y organelos dañados, además se eleva en condiciones de estrés, arritmias crónicas, isquemia e hipertrofia (57).

A su vez, en un estudio realizado en el año 2004 se logró observar que, en el corazón de ratas alimentadas regularmente, la autofagia mantenía niveles bajos, mientras que aquellas sometidas a ayuno de 48 horas el tamaño y número de los fagosomas estaba aumentado (58),

en el caso de la apoptosis se ha observado mayores cardiomiocitos apoptóticos en ratas diabéticas que en ratas normales (48).

1.3.3 Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de esta patología se establece cuando existe una disfunción ventricular con o sin síntomas que no son atribuibles a una enfermedad cardíaca propiamente tal (44). Sin embargo, en su etapa temprana es asintomática por lo que suele diagnosticarse por ecocardiográficas de rutina, donde además se evalúan los diferentes cambios estructurales y la función sistólica y diastólica, describiéndose 4 etapas desde los hallazgos iniciales hasta el daño irreversible como tal, éstas se agrupan como se indica la Tabla 1.1 (51). En relación al tratamiento, diversos autores indican que la prevención con hábitos saludables, factores de riesgo controlados como la glicemia y estudios complementarios tanto con la utilización de marcadores biológicos como por el uso de imágenes que permitan visualizar la disfunción sistólica y diastólica precozmente, podrían dirigir una terapia farmacológica para prevenir la fibrosis y así la disfunción cardíaca (59).

TABLA 1 .1: Clasificación de los diferentes estadios de la miocardiopatía diabética, cada uno de ellos con sus cambios característicos donde se expone la severidad de la progresión patológica desde el estadio 1 hasta el 4 (51).

Tabla 1 Estadios de la cardiopatía diabética				
Clasificación	Estadio 1	Estadio 2	Estadio 3	Estadio 4
Características	Hipertrofia Ventricular	Función ventricular normal o reducida	Función reducida microangiopatía	Función reducida, micro y macro angiopatía
Síntomas	Síntomas con grandes esfuerzos	Síntomas con esfuerzos moderados	Síntomas con esfuerzos pequeños	Síntomas en reposo
Cambios estructurales	Aumento de la masa ventricular	Dilatación y fibrosis	Dilatación + Y fibrosis	Dilatación Y fibrosis micro y macroangiopatía
Cambios funcionales	Disfunción diastólica	Disfunción sistólica y diastólica	Disfunción sistólica y diastólica	Disfunción sistólica y diastólica
Realce tardío Resonancia	Sin fibrosis	Posible fibrosis	Frecuente fibrosis	Fibrosis muy frecuente
Biomarcadores Troponina	Normales	Normales	Elevados en caso de inflamación o isquemia	Elevados en caso de inflamación o isquemia

1.4 MUERTE CELULAR

La regulación de la homeostasis es un elemento esencial para las células y para que este balance ocurra diferentes procesos se realizan, uno de ellos es la muerte celular, ésta es

fundamental para eliminar células a través de distintas vías bioquímicas que afectan sus características morfológicas, ya sea por activación genética (muerte programada), como por daño, mutaciones, entre otros (60). Dentro de los mecanismos de muerte celular se destacan la necrosis, apoptosis y autofagia. La primera se genera frente a una lesión aguda y está caracterizada por el aumento de volumen de la célula con su posterior ruptura, esparciendo su contenido a las células vecinas y activando una respuesta inflamatoria (9,61) la apoptosis en cambio, es un mecanismo de muerte celular ordenado, donde se activa una cascada proteolítica mediada por caspasas (9); y, por último, la autofagia corresponde a la autodigestión celular en respuesta a diferentes estímulos (50,62). Para los fines de este estudio, se describe a continuación los mecanismos de apoptosis y autofagia.

1.4.1 Apoptosis

En 1972, Kerr y su grupo de investigación acuñan el término apoptosis para referirse a la pérdida de células por parte de los tejidos para asegurar su sobrevivencia (63), en la que no se activan mecanismos de respuesta inflamatoria, cumpliendo un rol clave en el desarrollo, la eliminación de células anormales, dañinas, no funcionales (61). De acuerdo al Comité de nomenclatura de muerte celular (The Nomenclature Committee on Cell Death, NCCD), durante la apoptosis ocurren cambios morfológicos característicos, como lo son: que la célula adquiera forma redondeada, la reducción del volumen celular conocido como picnosis, la condensación de la cromatina, la fragmentación del núcleo o cariorrexis, la leve a nula modificación ultraestructural de los organelos, la formación de poros en la membrana plasmática que en las etapas finales alteran su integridad y la acción fagocitaria de células aledañas (64).

Este proceso de muerte celular es llevado a cabo por la acción crítica de cisteína-proteasas específicas de sustrato para aspartato llamadas caspasas (60,63), las que escinden sus sustratos en la zona carboxilo del residuo de ácido aspártico (65). En su forma inactiva, se denominan procaspasas, y presentan una estructura de tres partes: una región amino terminal (N), una zona de activación o dominio largo y una porción pequeña C terminal, cada una de estas partes separadas de la contigua por sitios de anclaje de ácido aspártico (66). Como zimógeno, permanecen como monómeros, mientras que en su forma activa es necesaria su dimerización, (66,67) lo que se logra mediante acciones proteolíticas entre sus dominios con la consiguiente asociación de la porción larga con la pequeña, formando un heterodímero, a su vez, la interacción de dos heterodímeros conforma un tetrámero con dos sitios catalíticos (68) y en

donde las porciones N terminales también son removidas (69), tal como se observa esquemáticamente en la Figura 1.9. Cada uno de los heterodímeros consta de un sitio activo para la unión de su sustrato y la catálisis (70).

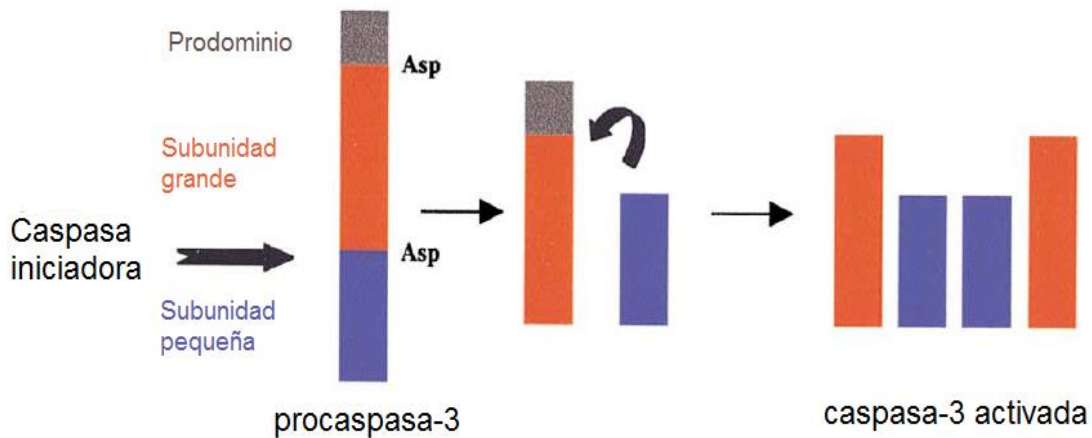


FIGURA 1.9: Esquema representativo del proceso de activación de una caspasa 3, en la que se evidencia la reorganización estructural entre sus dominios logrando su conformación como dímero. Modificado de (69)

Existen caspasas inflamatorias (1, 4, 5, 12, 13, 14) (66,70), y caspasas apoptóticas que, a su vez, se dividen en caspasas iniciadoras (2, 8, 9, 10) y ejecutoras (3, 6, 7) (69,70), las primeras constan de pro dominios de interacción proteína-proteína que permiten la formación de complejos que favorecen la auto ruptura en las zonas de residuos de ácido aspártico, en cambio, las segundas no tienen la capacidad de autoproteolizarse por lo que requieren de la acción de las caspasas iniciadoras para activarse (63).

El proceso de apoptosis tiene dos vías de acción: una extrínseca y otra intrínseca o mitocondrial, sin embargo, ambas actúan en forma conjunta permitiendo amplificar la señal de muerte haciéndola más efectiva (67). Las señales de muerte que desencadenan la activación de la apoptosis corresponden a señales extracelulares como ligandos en el caso de la vía extrínseca, y señales como una elevada oxidación intracelular, daño del ADN por rayos UV, radiación ionizante, fármacos, en el caso de vía intrínseca (67,70).

Dentro de los ligandos activadores se encuentran el ligando Fas y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), los cuales se unen a sus receptores de muerte dispuestos en la membrana celular (67). Estos receptores cuentan con un dominio extracelular para la unión de un ligando, un dominio transmembrana y uno intracelular (61). En la vía extrínseca el proceso se inicia con la unión de un ligando, como el ligando Fas ubicado en linfocitos citotóxicos, con su receptor

correspondiente (61,71), lo que genera cambios conformacionales que permite que el dominio de muerte (DD), secuencia ubicada en el extremo intracelular, se acople a una proteína adaptadora (61,67). Estos cambios atraen a caspasas iniciadoras inactivas, las procaspasas 8 o las procaspasas 10, generando un complejo proteico denominado complejos de señalización inductora de muerte (DISC) que activa a estas procaspasas gracias a su proximidad (67).

A su vez, durante la vía intrínseca de la apoptosis ocurre la permeabilización de la membrana externa de las mitocondrias lo que permite la liberación de proteínas que facilitan la apoptosis hacia el citosol, dada la importancia de este organelo para este proceso es que también se denomina vía mitocondrial, sin embargo también participa el retículo endoplasmático (RE) permitiendo la liberación de calcio (Ca^{+2}), lo que en conjunto, inicia eventos apoptóticos (67) generando estrés por la acumulación de proteínas en el RE y en el flujo irregular de Ca^{+2} intracelular (60). Uno de los elementos liberados desde las mitocondrias es el citocromo c, éste pertenece fisiológicamente a la cadena transportadora de electrones, pero cuando es liberado al citosol es capaz de unirse a una proteína adaptadora denominada factor 1 activador de la proteasa apoptótica (Apaf-1), la cual tiene un dominio de reclutamiento de caspasas (CARDS) (61). Esta interacción permite la oligomerización de la Apaf-1 y el reclutamiento de procaspasas 9 formando una estructura semejante a un anillo denominado apoptosoma, en la que dichas caspasas se activan gracias a la proximidad que existe entre ellas (61), tal como se muestra en la Figura 1.10.

Si bien cada caspasa cumple una función clave en el proceso apoptótico, es la caspasa 3 la principal responsable de los efectos apoptóticos siendo la que se encuentra en mayor medida en la célula y participando en la fragmentación de la cromatina gracias a su unión a los inhibidores de las nucleasas (69), además de utilizar como sustrato algunas proteínas estructurales y en enzimas de reparación del ADN. Esta caspasa ejecutora actúa tanto en la vía extrínseca interaccionando con la caspasa iniciadora 8, como en la vía intrínseca, haciéndolo con la caspasa 9 (65).

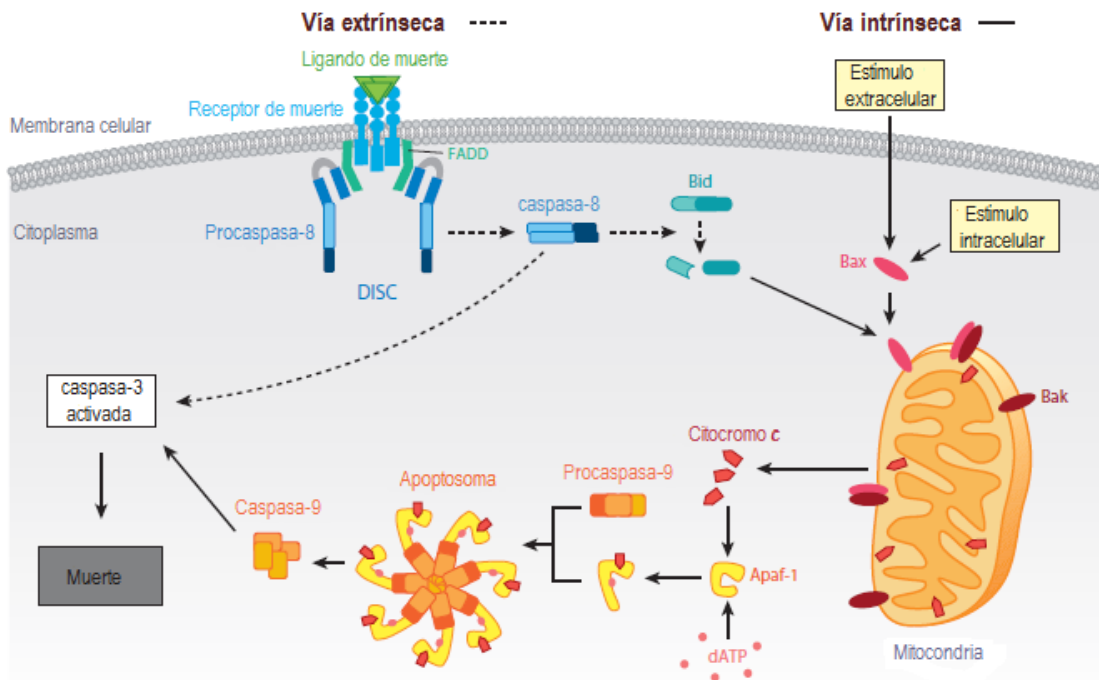


FIGURA 1.10: Esquema de los principales eventos de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis en una célula, dichas vías confluyen en la activación de la caspasa-3 que desencadena una cascada de interacciones para la muerte celular. Modificado de (61).

Existen proteínas que regulan la vía intrínseca de la apoptosis, las cuales pertenecen a la familia de las Bcl-2. Esta familia se puede dividir en tres grupos: las antiapoptóticas o prosupervivencia, proapoptóticas y las proapoptóticas solo-BH3 (Figura 1.11) (60,69). Las Bcl-2 pueden tener hasta 4 dominios denominados BH1, BH2, BH3 y BH4, las antiapoptóticas suelen tener los cuatro, en cambio las proapoptóticas, tienen de 1 a 3 dominios. Son ejemplos de proteínas Bcl-2, antiapoptóticas las Bcl-2, Bcl-x1, A1, entre otras; mientras que dentro de las proapoptóticas la Bax, Bcl-Xs, Bid y Bak (72).

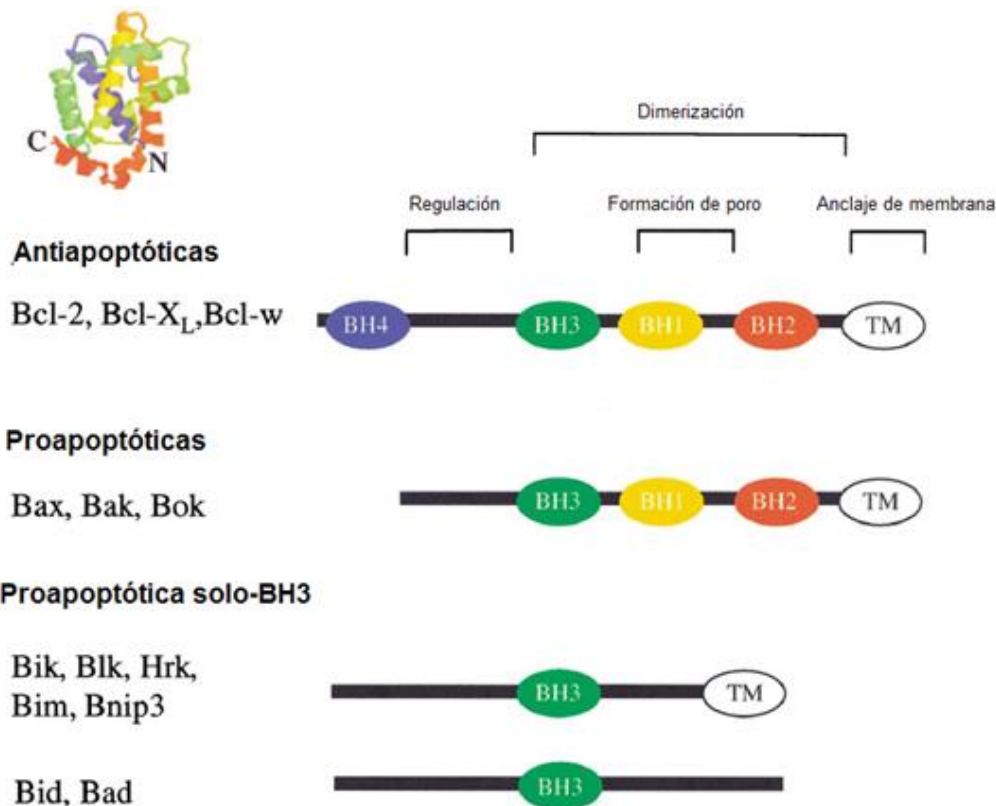


FIGURA 1.11: Clasificación de las proteínas de la familia BCL-2 de acuerdo a su acción: proapoptótica, antiapoptótica o BH3 proapoptótica, cada una con su particularidad estructural. Modificado de (69).

En células sanas BAK se encuentra en las mitocondrias, presentando un dominio transmembrana que sobresale en la membrana externa, mientras que BAX se encuentra en el citosol (67,73), sin embargo, cuando una señal apoptótica es suficientemente importante, se estimula a las proteínas BH3 (Bad, Bid, Noxa, etc.) que transmiten la señal para que, principalmente, BAX y BAK se oligomericen logrando permeabilizar la membrana externa de las mitocondrias y desde allí inducir la liberación del citocromo c (61,73) que desencadena lo descrito anteriormente.

1.4.2 Autofagia

La autofagia corresponde a un mecanismo de autodigestión celular que ocurre en respuesta a estímulos como organelos dañados, proteínas longevas, proteínas mal plegadas, hipoxia y falta de nutrientes (62), su mecanismo molecular fue descrito por primera vez en levaduras en el año 1992 por el profesor Yoshinori Ohsumi, quien observó cómo las células de levaduras indujeron la secuestro de componentes de su propio citoplasma en una vacuola como respuesta a la falta de nutrientes (74).

Este proceso presenta dualidad de acción en la sobrevivencia celular: corresponde a un mecanismo que permite la sobrevivencia de la célula frente a condiciones adversas (75) participando en diferentes procesos como la regulación del crecimiento, diferenciación, respuestas frente al estrés oxidativo, reciclaje de organelos y macromoléculas (62); siendo la falta de glucosa, factores de crecimiento, oxígeno y aminoácidos los principales inductores de esta actividad catabólica (58), sin embargo, bajo ciertas circunstancias, puede funcionar como una vía de muerte celular en la que se ha observado, bajo microscopio electrónico, la presencia de un gran número de vacuolas autofágicas en el citoplasma celular (76). El NCCD define la muerte celular por autofagia como cambios morfológicos visibles en microscopía electrónica de transmisión en la que no hay presencia de cromatina condensada, pero sí una gran cantidad de vacuolas citoplasmáticas asociadas a la autofagia y en que la acción fagocítica es poca o nula (64).

Se reconocen tres formas de autofagia: dependiente de chaperonas, microautofagia y macroautofagia. En la primera se requiere que receptores lisosomales reconozcan una secuencia motivo en las proteínas citosólicas para su ingreso a la vacuola; a su vez, en la microautofagia se produce una invaginación de la membrana de la vacuola permitiendo la degradación del contenido absorbido; y por último, en la macroautofagia se forma un autofagosoma como resultado de una vesícula doble membrana independiente que se juntará con lisosomas, secuestrando el contenido a degradar, y es a esta forma que se le denomina autofagia como tal (75,76,77) y será descrita a continuación.

En el inicio de la autofagia ocurre la aparición de una estructura de doble membrana en forma de "C" en el citoplasma celular (78,79), en el caso de los mamíferos se ha postulado que esta estructura proviene de la región ribosomal libre del RS, sin embargo, también se sugiere la existencia de esta membrana como un organelo individual denominado fagóforo (75,78). Posteriormente esta estructura se cierra formando una vacuola en la que se quedan atrapadas las sustancias a degradar, lo que conforma el autofagosoma, éste se fusiona con una vacuola lisosomal conformando un cuerpo autofágico que degrada su contenido por la acción enzimática (78,79).

Molecularmente la primera etapa de este proceso está regulada por la acción crítica del complejo diana de la rapamicina: TORC en levaduras y mTORC en mamíferos. Este complejo consta de dos formas: Tor 1 y Tor 2, sin embargo, es en el primero el que desempeña un papel

clave en la autofagia (80) y está conformado por 5 proteínas que, en su conjunto, son reguladas por fosforilación/desfosforilación (58,57).

Tanto la insulina como factores de crecimiento y otras señales metabólicas (81), mantienen la TORC1 activada por lo que se inhibe la autofagia; por otra parte, cuando los niveles de nutrientes son bajos, TORC 1 se inhibe y en consecuencia se activa la autofagia (79,80). En su forma activa TORC1 fosforila al complejo ULK manteniéndolo inactivo, mientras que la inactivación de TORC1 permite la activación del complejo ULK (79). Además de TORC1, existen otras proteínas reguladoras del complejo ULK como las AMPK (proteína quinasa dependiente de adenosina monofosfato) y PKA (proteína quinasa) (57,58).

Cuando existe una señal para activar la autofagia, la proteína ULK1 (perteneciente al complejo ULK) fosforila y activa a la proteína ATG6 en levaduras, también llamada Beclin-1 en mamíferos, de esta interacción se obtiene como producto PIP3 (3-fosfatidilinositol fosfato) que permite el reclutamiento de más ATGs sobre la doble membrana de la vacuola en crecimiento (57,58). Este fagóforo continúa su crecimiento o elongación gracias a la interacción con otros complejos proteicos pertenecientes a la familia de proteínas ATG (57,58).

Posteriormente, tras diversas interacciones proteicas, se forma un nuevo complejo al cual se acopla la ATG8 también conocida como LC3 II (proteínas asociadas a los microtúbulos de la cadena ligera) (57,58). La unión de LC3 II al fagóforo cierra la vesícula formando el autofagosoma. Una vez formado el autofagosoma y por acción de la autofagina, los complejos formados son liberados de la membrana externa, de esta forma el autofagosoma se puede fusionar con los lisosomas, evento mediado por la proteína Rab7, Lamp1 y Lamp2, lo que genera la formación del autofagolisosoma (57,58). Finalmente, el contenido a degradar se vierte y se degrada en el autofagolisosoma (57,58). El proceso descrito anteriormente se puede observar a continuación en la Figura 1.12.

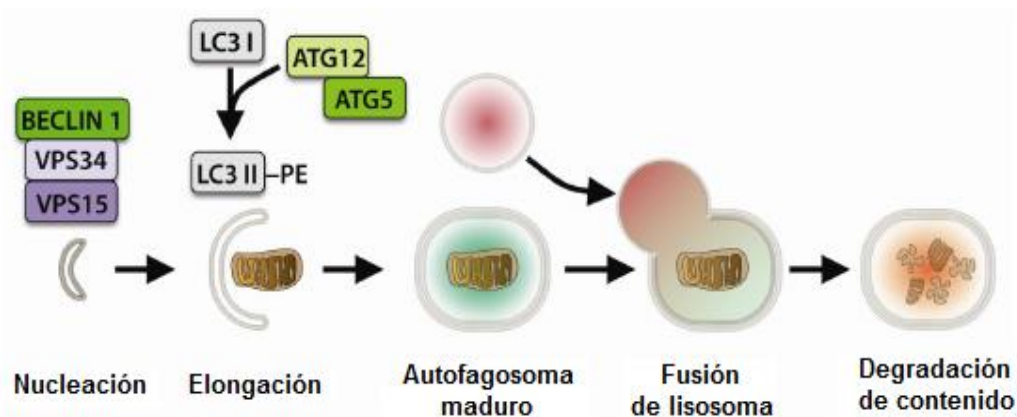


FIGURA 1.12: Esquema de las vías de autofagia con la interacción entre diversas proteínas permitiendo la elongación del fagóforo y posteriormente cierre de la vacuola (82).

Como anteriormente mencionado, la proteína Beclin-1 es una de las más relevantes dentro del complejo ULK y se activa por fosforilación. Para que el proceso de autofagia ocurra, esta proteína debe desvincularse de la proteína Bcl-2 y formar dímeros para interactuar con PI3-kinasa III o Vps34, estos complejos pueden ser observados en zonas de compartimentos autofagosomales en el citoplasma mediante técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, por ende, su actividad en condiciones normales es inhibida por la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (83,84).

1.4.3 Muerte celular en patología cardíaca

Los procesos de muerte celular se generan como respuesta a diversas alteraciones por lo que forman parte de distintas cardiopatías (85). En el caso de la apoptosis ha sido relacionada con el infarto agudo al miocardio, lesiones de isquemia-reperfusión, la displasia ventricular derecha y también en las etapas finales de la cardiomiopatía dilatada e isquémica (86). Además, considerando la función del corazón, las células cardíacas están expuestas a estímulos que impulsan remodelación, cambios de tamaño celular y mecanismos metabólicos protectores, por lo que es necesario que existan vías que permitan un recambio proteico para mantener la actividad del sarcómero de forma eficiente, siendo la autofagia una de ellas, desempeñando un rol fundamental en la degradación del colágeno y la remodelación celular presentándose como un mecanismo de protección de las células cardíacas (87).

La muerte celular en la diabetes se ha observado en diversos órganos en modelos *in vivo* y en células endoteliales *in vitro* (85). En el caso de la miocardiopatía diabética, tal como se ha

mencionado con anterioridad, es conocido que forman parte de los mecanismos del daño cardiaco tanto la hiperglicemia, como la resistencia a la insulina, los ácidos grasos, el estrés oxidativo, los procesos inflamatorios, la fibrosis, hipertrofia, disfunciones mitocondriales, estrés del RE y la disfunción endotelial, en que la muerte celular es una de las últimas alteraciones de las células cardiacas (71). A su vez, se ha evidenciado que la hiperglicemia induce a la apoptosis de los cardiomiocitos y en consecuencia se genera la disminución de la función contráctil promoviendo la remodelación del corazón (71,88), 61 veces más en células endoteliales y 26 veces más en fibroblastos en comparación a controles (88). Además, se ha evidenciado que, tanto en pacientes diabéticos hipertensos como en diabéticos sin hipertensión, no se presentaron diferencias en los niveles de apoptosis, por lo que se sugiere que la hipertensión no es responsable de la muerte del miocardio, sino la diabetes por sí sola (88). Por otra parte, considerando las vías apoptóticas y el requerimiento por parte del corazón de un flujo energético preciso proveniente de la energía oxidativa mitocondrial, los defectos en este organelo también están asociados a enfermedades cardiovasculares (89).

Del mismo modo, los primeros datos que conectan la autofagia con el desarrollo de patologías cardiacas fueron obtenidos en pacientes con cardiomiopatía dilatada, además diversos estudios han relacionado la autofagia con el desarrollo de diabetes, desórdenes inflamatorios, infecciones e incluso el cáncer (76,90), por ende, bajo ciertas condiciones protege y potencia la sobrevivencia celular, mientras que en otros escenarios favorece el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (58). En investigaciones de isquemia-reperfusión se ha visto que la autofagia pareciera cumplir un rol protector durante la isquemia (activada por AMPK) y dañino durante la perfusión (dependiente de Beclin-1) (58), otros autores sostienen que durante la isquemia actúa como un proceso adaptativo en la que podría eliminar mitocondrias dañadas para contrarrestar la generación de ROS (76) y reduciendo la apoptosis (87), sin embargo, durante la perfusión no está claro si es beneficiosa o no, debido a que experimentalmente se ha observado de ambas formas (76).

En diversos modelos se sugiere que la autofagia se muestra como mecanismo que previene la apoptosis al retirar los componentes dañados, (90) removiendo proteínas pro apoptóticas o generando inhibidores de las caspasas (91), por lo que al inhibir la autofagia se desencadenan procesos apoptóticos, en cambio, su actividad previene los estímulos apoptóticos (92). En el caso de la cardiomiopatía diabética, en la diabetes tipo 2, algunos estudios sugieren la autofagia como mecanismo de compensación frente a la resistencia a la insulina, permitiéndoles a las células cardiacas mantener su función y estructura, sin embargo, otros

modelos barajan resultados no definitivos, donde se han demostrado que su actividad está disminuida (76), otros resultados la establecieron como aumentada e incluso se ha observado sin alteraciones (50).

1.5 PROYECCIONES

De acuerdo a la literatura, se infiere que la muerte celular por apoptosis a nivel cardiaco, es un mecanismo fundamental en la progresión patológica (71,85,88,93); mientras que en el caso de la autofagia sus resultados son dispares (50,58). Por otra parte, las investigaciones han demostrado que existe un aumento progresivo de fibrosis directamente proporcional al progreso de MCD en periodos cortos de tiempo (46). Considerando lo anterior, es que diversos estudios avalan continuar de manera más profunda con la investigación de los mecanismos afectados en la MCD ya que aún se desconocen a cabalidad la complejidad de sus vías (40,42,49). Del mismo modo, el conocimiento en relación a la progresión temporal de estos elementos previo al daño funcional del corazón diabético, es aún más desconocido y no han sido dilucidados.

Finalmente, la utilización de animales para investigación cumple un rol fundamental en el estudio fisiopatológico de enfermedades como lo es la MCD. Una de las vías para desarrollar este modelo biológico, es la utilización de un inductor químico en roedores, que corresponde a un fármaco llamado estreptozotocina (STZ), este es un antibiótico y es ampliamente utilizado en investigación, donde se caracteriza por causar una destrucción en las células beta de los islotes del páncreas de estos animales, lo que, a su vez, genera la disminución de insulina y desencadena una hiperglicemia, lo que se conoce como diabetes experimental (46,94). Utilizando este modelo se han desarrollado diversas investigaciones en la que se han evidenciado los eventos antes mencionados, como el aumento de ERO y el deterioro mitocondrial (41), mientras que otros se centran en buscar medidas terapéuticas efectivas (49); en ambos casos los procesos de muerte celular por apoptosis y autofagia podrían cumplir un rol importante en el progreso patológico (56,76).

1.6 HIPÓTESIS

Existen diferencias en la marcación de apoptosis, autofagia y fibrosis en el miocardio de ratas Sprague Dawley adultas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina y las ratas control, a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección, esto de acuerdo a lo observado en diferentes estudios que han demostrado que en la diabetes mellitus puede haber complicaciones a nivel

cardíaco (miocardiopatía diabética) donde las alteraciones metabólicas forman parte del desarrollo patológico.

CAPÍTULO 2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Comparar la marcación de fibrosis, apoptosis y autofagia en miocardio de ratas adultas Sprague Dawley con y sin diabetes mellitus inducida por estreptozotocina a las 2, 4, 8 y 12 semanas.

2.1.2 Objetivos específicos

- A. Describir el porcentaje de **fibrosis** en el miocardio de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina y ratas sin diabetes (control), a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección.
- B. Describir el porcentaje del área de inmunomarcación de **apoptosis y autofagia** en el miocardio de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina y ratas sin diabetes (control), a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección.
- C. Describir la intensidad de pixeles de inmunomarcación de **apoptosis y autofagia** en el miocardio de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina y ratas sin diabetes (control), a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección.
- D. Comparar el porcentaje de fibrosis en el miocardio de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina y ratas sin diabetes (control), a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección.
- E. Comparar el porcentaje de área de inmunomarcación de apoptosis y autofagia en el miocardio de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina y ratas sin diabetes (control), a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección.
- F. Comparar la intensidad de pixeles de inmunomarcación de apoptosis y autofagia en el miocardio de ratas adultas de la cepa Sprague Dawley con diabetes mellitus inducida

por estreptozotocina y ratas sin diabetes (control), a las 2, 4, 8 y 12 semanas post inyección.

CAPÍTULO 3. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se enmarca en el proyecto elaborado por el Dr. Rienzi Díaz denominado “*Muerte celular y fibrosis en miocardio de ratas con diabetes mellitus experimentalmente inducida por estreptozotocina*” el cual fue aprobado previamente por el Comité Institucional de Bioética para la Investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso en el año 2018 (Anexo 1). Experimentalmente, esta investigación se considera de riesgo mínimo dada la disponibilidad de muestras procesadas y físicamente almacenadas en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas perteneciente al Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso. Infelizmente, al inicio del año 2020, ocurre a nivel mundial la emergencia sanitaria producto del COVID-19, generando el cierre de las dependencias universitarias incluyendo laboratorios, lugar físico donde se desarrollaría el experimento para esta investigación. Por lo tanto, con el propósito de mantener la viabilidad de este estudio se realizaron modificaciones en conjunto con la asesoría de los tutores para generar resultados simulados utilizando herramientas computacionales.

A continuación, se describen los procedimientos realizados por el proyecto base para la obtención de muestras y las modificaciones necesarias para su actual formato teórico.

3.1 ANIMALES Y PROCESAMIENTO

En la investigación base se utilizaron 40 ratas adultas machos de la cepa Sprague Dawley, las cuales recibieron agua y comida ad libitum, ciclo circadiano de luz-oscuridad 12:12 h, ambiente con temperatura de 21°C y humedad del 50%, ventilación controlada y libre de ruido. Para inducir la diabetes mellitus, tras 12 horas de ayuno, se aplicó una única inyección vía intraperitoneal de 65 mg/kg, ip de STZ disuelta en buffer citrato 0.1M de pH 4.5, a la mitad de las ratas. En el caso de las ratas utilizadas como control solo se inyectó buffer citrato 0.1M, pH 4.5. Luego se procedió a confirmar la hiperglucemia una vez por semana (glucosa en sangre > 200 mg/dL), utilizando un glucómetro y muestras de sangre obtenida desde la vena femoral de cada rata. De este modo el diseño experimental se definió de la siguiente manera: 20 animales diabéticos y 20 controles, ambos grupos dividido a su vez en 4 grupos de acuerdo a la semana de sacrificio (2, 4, 8 y 12 post inyección) con un n=5 para cada uno, tal como lo muestra la Tabla 3.1.

TABLA 3. 1: División y tiempo de sacrificio para cada grupo de las 40 ratas utilizadas en el estudio.

GRUPO	TIEMPO DE SACRIFICIO	RATAS DIABÉTICAS	RATAS CONTROL
1	2 semanas post SZT	n=5	n=5
2	4 semanas post SZT	n=5	n=5
3	8 semanas post SZT	n=5	n=5
4	12 semanas post SZT	n=5	n=5

Para el sacrificio de los animales en el tiempo que correspondía, se utilizó una caja de inducción anestésica en la que se administró isoflurano 5% mezclado con oxígeno al 100%. A continuación, luego de la anestesia y verificando que las ratas no tenían reflejos, se procedió a realizar la extracción del corazón de cada una, éstos se cortaron en 3 secciones con un grosor de 3 mm a lo largo del eje corto del ventrículo izquierdo desde el ápex a la base. Las ratas fueron numeradas en orden consecutivo y cada una de las secciones fue designadas como A, B y C (Figura 3.1). Por lo tanto, la sección superior del corazón de la rata 1 fue designada como R1A, la zona media como R1B y la zona inferior como R1C. Se siguió la misma lógica para todas las secciones de corazón de todas las ratas del proyecto, cambiando el número correlativo de la rata. Todas las muestras fueron fijadas en formalina tamponada al 10% con su posterior inclusión en parafina, los que fueron almacenados en el laboratorio a temperatura ambiente (21°C) y sin exposición a la luz solar u otras fuentes de calor.

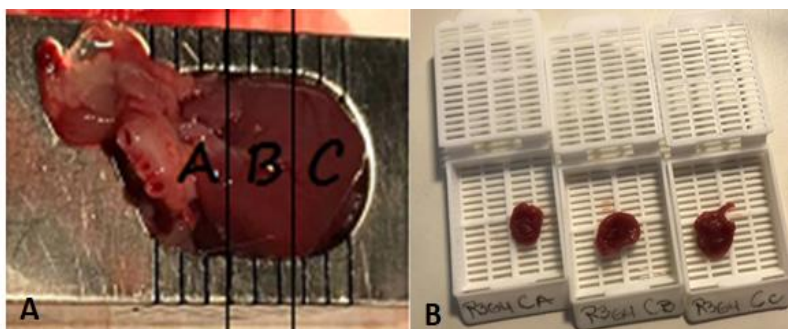


FIGURA 3 1: En A se muestra esquemáticamente los cortes que se realizaron para obtener las zonas A, B y C de cada corazón. Posteriormente, como se observa en la fotografía B, son

depositados en su cassette con la rotulación correspondiente para continuar con el procesamiento.

Por otra parte, para el desarrollo de la investigación en su modalidad teórica se utilizó el mismo diseño experimental, sin embargo, tras la recopilación y revisión de información, se consideró una única muestra de miocardio para cada rata y no tres secciones (A, B y C) cómo se había planteado experimentalmente, de este modo cada grupo se denominó según el tiempo de sacrificio (semanas) acompañado de una C para control o DM para las diabéticas, por ejemplo: 2C para el grupo control de la semana 2 y 2DM para el grupo diabético de la semana 2. Además, para que la investigación fuera estadísticamente viable, se realizó un nuevo cálculo del tamaño muestral, tal como se detalla a continuación. Ambas modificaciones responden a los requerimientos de la simulación de resultados.

3.2 SIMULACIÓN DEL TAMAÑO MUESTRAL

Para realizar este nuevo cálculo, se procedió a buscar a través de un notebook con conexión a internet en las principales bases de datos, tales como: PubMed, Google Académico y Scientific electronic library online (Scielo), un artículo científico en que se abarcara características similares al modelo planteado de esta investigación y teniendo como referencia la variable fibrosis, debido a que es la más reportada científicamente.

Los criterios utilizados para la búsqueda fueron:

- Estudio realizado en modelos murinos con miocardiopatía diabética entre los años 2005 a 2020.
- Modelo diabético obtenido mediante inducción por estreptozotocina.
- Aplicación de una o varias inyecciones intraperitoneales de estreptozotocina, con dosis entre 50 a 70 mg/kg.
- Realización de una cuantificación porcentual de colágeno mediante técnicas histoquímicas.

Bajo estas condiciones, previa revisión y selección de artículos, se eligió trabajar con el estudio denominado *“Atorvastatin alleviates experimental diabetic cardiomyopathy by suppressing apoptosis and oxidative stress”* publicado en el año 2015 en el *Journal of*

molecular histology (95). Posteriormente, se extrajeron valores de referencia y se utilizó la siguiente fórmula:

$$n = \frac{2(z_{\alpha} + z_{\beta})^2 * s^2}{d^2}$$

Donde z_{α} corresponde a 1.645, $z_{\beta} = 0,842$ (potencia del 80%), s^2 con un valor de 0,3 y $d = 0,8$.

Al realizar el cálculo se obtuvo un resultado de $n=9$ para cada grupo. De esta forma el n total para esta investigación se modificó a 72 ratas (36 controles y 36 diabéticas) divididas en cada grupo tal como se planteó en el diseño experimental.

3.3 SIMULACIÓN DE GLICEMIAS

Para determinar la concentración de glucosa en sangre se procedió a buscar en las principales bases de datos de bibliografía científica, investigaciones que cumplieran las siguientes condiciones:

- Estudio realizado en modelos murinos con miocardiopatía diabética entre los años 2005 a 2020.
- Modelo diabético obtenido mediante inducción por estreptozotocina.
- Aplicación de inyección intraperitoneal de estreptozotocina, con dosis entre 50 a 70 mg/kg.

Tras la revisión y selección de artículos con los criterios impuestos (95,96,97,98), se obtuvo un promedio con sus glicemias junto al promedio de sus desviaciones estándar, previa conversión de unidades a miligramos por decilitro (mg/dL) cuando correspondía.

Una vez conseguida esta información, a través del software Microsoft Excel, se utilizó la herramienta de “Generación de números aleatorios” tal como lo muestra la Figura 3.2, con la finalidad de simular valores de glucemias bajo un comportamiento uniforme.

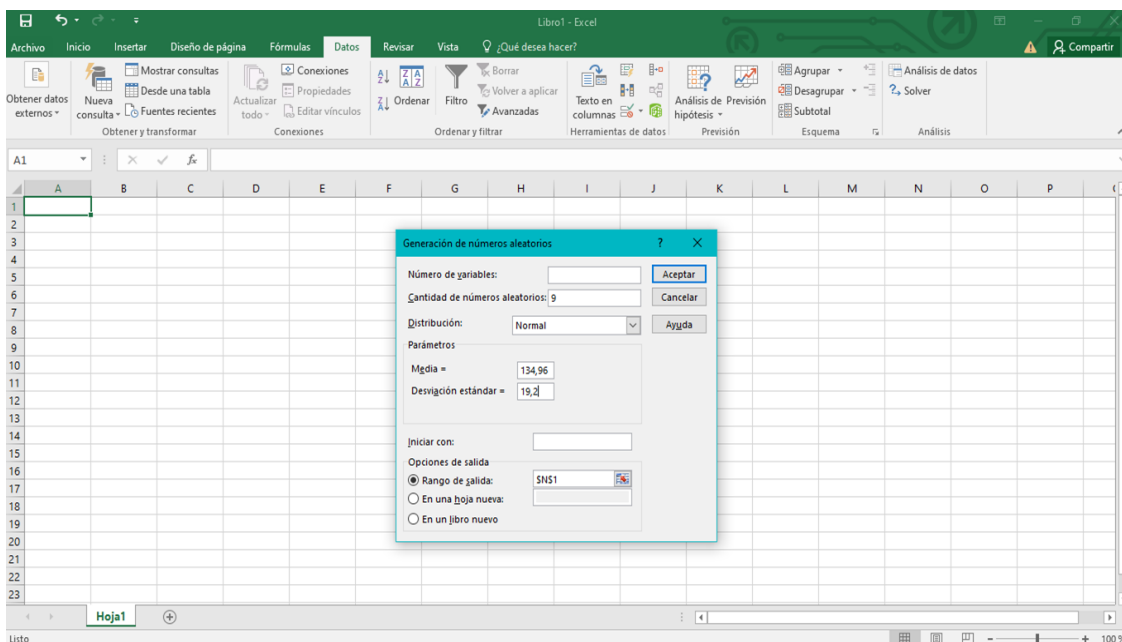


FIGURA 3. 2: Imagen del programa Microsoft Excel con la herramienta de generación de números aleatorios, en el centro se detalla una distribución normal.

3.4 TÉCNICA HISTOQUÍMICA

Experimentalmente, para lograr determinar las zonas del tejido cardiaco que presentan fibrosis, se escogió emplear la técnica para fibras colágenas denominada Tricrómico de Masson, caracterizada por evidenciar la presencia de este componente con la coloración azul.

Para ello, en el laboratorio se procedería a realizar cortes de 5 micras en un micrótopo (marca ACCU-CUT, modelo SRM 200 CW) a cada uno de los bloques almacenados por rata, estos 3 cortes (A, B y C) pasarían a ser adheridos a un portaobjeto previamente xilanizado y rotulado según la rata y semana de obtención de la muestra, permitiendo la adquisición de láminas histológicas con las 3 secciones en estudio para cada rata. Éstas, posteriormente serían procesadas gradualmente desde la desparafinación hasta el montaje de acuerdo al protocolo adjuntado como anexo 2. Además, para verificar el procesamiento de la técnica a implementar, se utilizaría como control externo, un corte de corazón humano infartado, el cual sería facilitado por el laboratorio.

Para la identificación de zonas fibróticas, se procedería a observar todas las láminas con sus tres zonas (A, B y C) con un microscopio óptico Olympus CX21 con cámara integrada Olympus U-TVO conectado a un computador, luego, a través del software Motic images plus 2.0, se elegiría un campo al azar de cada una de las zonas en un aumento de 10x y se procedería

a tomar una microfotografía. Posteriormente, las microfotografías serían analizadas digitalmente con el software Image J y con las herramientas del programa se definiría el porcentaje de área con fibrosis sobre el área total de la imagen, siendo el análisis de cada imagen realizado por dos observadores para calcular el promedio entre ambos porcentajes obtenidos.

En su desarrollo teórico, para obtener datos porcentuales de fibrosis, se procedió a buscar en la literatura, investigaciones científicas que cumplieran los mismos criterios que en la simulación del tamaño muestral. Una vez recopilados y seleccionados los archivos, se generó una planilla en Microsoft Excel en la que se ingresaron los datos de cada uno de estos documentos, destacándose: el n utilizado, las semanas de sacrificio de los animales, la media del % de fibrosis y la desviación estándar de ésta, tal como indica la Figura 3.3.

Paper	DOI/ link	n muestral	tiempo (sem)	Media gli (mmol/L)	E glic (mmol/L)	Media % fibrosis	DE % fibrosis	media (u) beclil	DE (u) beclil	media (u) caspa	DE (u) cas
Treatment with crocin improves	https://doi.org/	4	8	5.39	0.29	0.99	0.1	0.89	0.01	0.01	6.51 E
Dihydropyridin Protects agai	https://doi.org/	6	0	8.36	1.77	0	0	0	0	0	0
			16	8.54	1.26	5.95	0.63	0	0	0	0
Inhibition of high-mobility group	http://dx.doi.org	8	16	0	0	8.87	2.06				
Inhibition of Pin1 alleviates myo	http://dx.doi.org	8	16	0	0	9.25	1.27	0	0	0	0
Salvianolic acid B improves my	https://doi.org/	20	17	0	0	8.68	1.09	0	0	0	0
Andrographolide Ameliorates D	https://doi.org/	--	12	0	0	1.21	0.06	0	0	0	0
Cardiomyocyte-fibroblast inter	http://dx.doi.org	3	6	0	0	0.87	0,6	0	0	0	0
Inhibition of myocyte-specific	www.impactjou	25	20	9.40	1.37	9.19(inters)	1.62	0	0	0	0
						13.19 (perv)	1.62				
Atorvastatin alleviates experim	DOI 10.1007/s	8	6	6.22	0.78	0.42	0.22	0	0	0.96	0.23

FIGURA 3. 3: Imagen de la planilla generada en Microsoft Excel con la recopilación de los datos de los artículos seleccionados.

Luego, los datos correspondientes a las semanas de sacrificio de los animales y las medias de fibrosis de cada uno los artículos seleccionados, se ingresaron al software Graph Pad 8 para obtener una gráfica de semanas versus media de fibrosis y así observar la línea de tendencia de los datos de la variable (Figura 3.4). Utilizando una herramienta del mismo software, se obtuvo la ecuación de la recta de dicha línea de tendencia que permitió extrapolar los datos de medias de fibrosis para las semanas de interés de esta investigación (2, 4, 8 y 12).

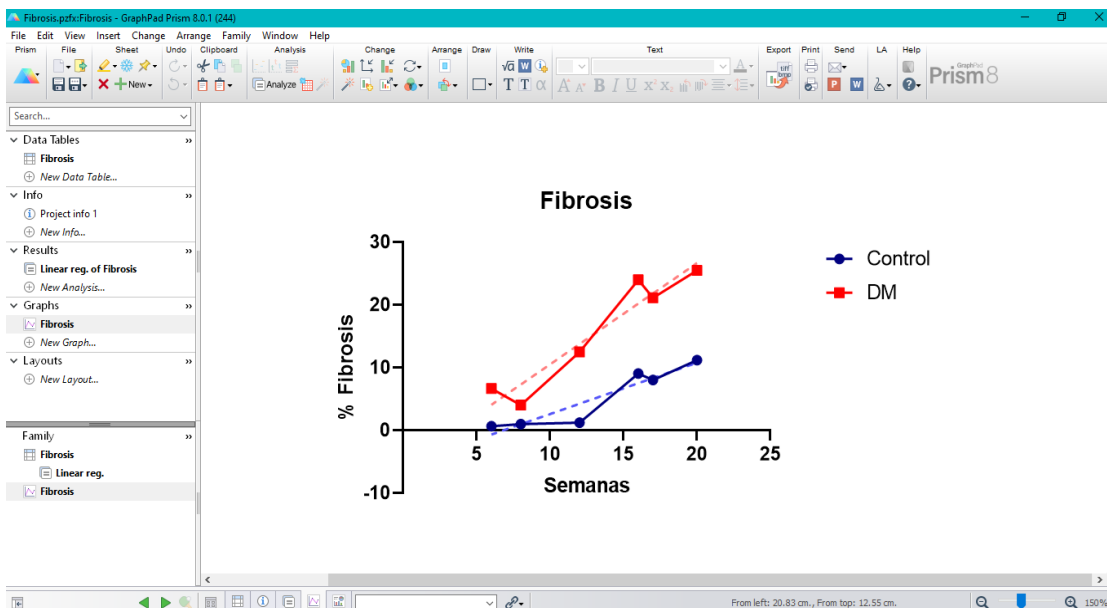


FIGURA 3. 4: Imagen que representa lo visualizado el programa Graph pad 8 tras el ingreso de datos, las líneas punteadas corresponden a las líneas de tendencia de las cuales se obtuvo la ecuación de la recta.

Para determinar las desviaciones estándar de las medias obtenidas, se elaboró, utilizando el mismo software, un gráfico de medias de fibrosis versus desviación estándar de fibrosis de las mismas investigaciones ya mencionadas, para obtener la línea de tendencia de esta variable. Del mismo modo, a partir de la línea de tendencia se obtuvo la ecuación de la recta en donde se pudo extrapolar los datos de las desviaciones estándar de fibrosis obtenidas previamente y que son de interés para este trabajo investigativo.

3.5 TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA

Originalmente, tanto para el estudio de apoptosis como el de autofagia se procedería a realizar la técnica de inmunohistoquímica, en el primer caso con el anticuerpo anti-caspasa-3-activada (ab2302) y en el segundo con el anticuerpo anti-Beclin-1(ab62557) disponibles en el Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso.

Se pretendía realizar cortes de 5 micras a cada molde de las muestras y cada corte, posteriormente, adherido a un portaobjetos con doble poli-L-lisina donde se derivaría al procesamiento según lo establecido en el protocolo del anexo 3 para caspasa-3-activada y el anexo 4 para Beclin-1, dichos protocolos se obtuvieron mediante la realización de

estandarizaciones que permitieron elegir las diluciones de los anticuerpos primarios y secundarios, además de los tiempos con mejores resultados. En el caso de Beclin-1 el anticuerpo primario tendría una dilución de 1:250 con su anticuerpo secundario diluido en 1:1000, mientras que para caspasa-3-activada se implementaría una dilución experimental del anticuerpo primario en 1:50 y 1:100; y con su anticuerpo secundario en 1:250, cuyas concentraciones quedaron pendientes de confirmación dado a la situación actual del país.

Para la verificación del procedimiento, se implementarían dos controles, un control positivo externo y uno negativo externo, en el caso de Beclin -1 será una muestra de cáncer cervicouterino y en el caso de caspasa-3-activada hígado humano, ambos adquiridos en el laboratorio. Al control negativo externo, no se le incubaría el anticuerpo primario y en su lugar, se utilizará una solución de PBS al 10%.

Para el análisis inmunohistoquímico se observaría cada placa con sus tres zonas (A, B y C) mediante un microscopio óptico con cámara integrada conectado a un computador. Se seleccionaría, con aumento de 40x, 10 campos al azar de cada zona de los portaobjetos para luego, utilizando el software Image J, obtener la relación entre área con marcación inmunohistoquímica y el área total de cada campo elegido. A su vez, para el análisis de intensidad, las imágenes se trabajarían con el mismo software al cual se le integrarían los datos de intensidad, para luego seleccionar la zona de interés y calcular la intensidad recíproca, cuyo valor 0 corresponde a lo más oscuro y 250 para lo más claro (37). En ambos casos, porcentaje e intensidad, se procederá a obtener un promedio de las 10 fotografías para tener un único valor por zona y, a su vez, cada imagen sería analizada por dos observadores para luego calcular el promedio.

Para obtener los datos teóricos de la variable de porcentaje del área de inmunomarcación de caspasa-3-activada y Beclin-1, se recolectaron y seleccionaron estudios con las siguientes características:

- Estudio realizado en ratas con miocardiopatía diabética.
- Uso del modelo diabético inducido por estreptozotocina.
- Aplicación de técnica inmunohistoquímica de caspasa-3-activada y/o Beclin-1.
- Presentar al menos una microfotografía de las técnicas inmunohistoquímicas tanto del control como de los animales diabéticos.

Considerando la información que entregaban las fotografías inmunohistoquímicas es que, en conjunto con el tutor de tesis, se procedió a realizar una estimación cualitativa del porcentaje de inmunomarcación del anticuerpo para caspasa-3-activada (95,99,100) y Beclin-1 (101), extrapolando los datos para cada semana de interés. De esta forma se generó un rango de valores para los controles y otro para los DM en cada uno de los tiempos, luego se ingresaron estos datos en la herramienta generación de datos aleatorios y bajo un comportamiento uniforme, se obtuvieron los resultados. Este procedimiento responde a la falta de información de estudios inmunohistoquímicos para los marcadores.

A su vez, para el estudio de muerte celular en relación a la variable de intensidad de inmunomarcación, producto de la escasez de información de estudios inmunohistoquímicos para los marcadores de este proyecto, es que se realizó una búsqueda en las mismas bases de datos mencionadas anteriormente, los siguientes criterios:

- Estudio realizado en ratas con miocardiopatía diabética.
- Uso del modelo diabético inducido por estreptozotocina.
- Estudios de Western Blot para caspasa-3-activada y/o Beclin-1.
- Que se haya realizado una cuantificación de estas proteínas en unidades arbitrarias.

Posteriormente se procedió del mismo modo que para los datos de la variable de fibrosis, es decir, se creó una planilla Excel para recopilar la información más relevante de cada artículo científico (Figura 3.5) y se crearon gráficos de medias, ya sea de caspasa-3-activada o Beclin-1 v/s semanas de sacrificio, para luego obtener la línea de tendencia con su ecuación de la recta y extrapolar datos de medias en las semanas de interés.

Paper	DOI/ link	n muestrastral	tiempo (semanas)	Media glic (mmol/L)	DE glic (mmol/L)	media % fibrosis	DE % fibrosis	media beclin (u)	DE beclin (u)	media caspasa (u)	DE % caspasa	n muestra
Chloroquine improves left ventricl	https://www.dovep	8	11	9.14	0.3	0.87	0.08	0.58	0.06	0	0	8
Heme Oxygenase-1 Prevents Card	10.1371/journal.pone.0181111	12	0.17	7.6	0.3	0	0	0	0	0	0	12
Histone deacetylase inhibition of c	10.3892/mmr.2017.1414	5	8	0	0	0	0	0.79 u	0.06 u	0	0	5
Hydrogen sulfide attenuates myoc	10.3892/ijmm.2018.1111	10	8	6.91	0.45					n=3 0.5u	0.01u	10
Treatment with crocin improves ca	https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.1111	4	8	5.39	0.29	0.99	0.1	0.89	0.01	0.01	0.001/0.01 DS	4
Activating Cannabinoid Receptor 2	doi: 10.3389/fphar.2018.01811	5	14	S/	S/	0	0	1	0.04	0	0	5
Early administration of trimetazidi	10.1186/s12967-018-1111-1	6	9	0	0	0	0	0	0	0.33	0.13/0.32 DS	6
Nicorandil alleviates apoptosis in d	10.1111/jcmm.14411	15	12							0.22	0.08	15

FIGURA 3. 5: Imagen de la planilla generada en Microsoft Excel con la recopilación de los datos de los artículos seleccionados para la variable de intensidad.

En el caso de las desviaciones estándar de las medias, se elaboró un gráfico de medias de caspasa-3-activada o Beclin-1 v/s desviación estándar de las investigaciones seleccionadas y se obtuvo la línea de tendencia con su respectiva ecuación de la recta, esto permitió generar las desviaciones estándar de las medias que se obtuvieron anteriormente correspondientes a la semana 2, 4, 8 y 12.

Considerando lo anteriormente planteado, la unidad de medición de esta variable de intensidad se modificó a unidades arbitrarias.

3.6 GENERACIÓN DE DATOS

Una vez obtenidos los datos de medias y desviaciones estándar para cada variable (fibrosis, autofagia y apoptosis) en cada uno de los tiempos establecidos (2, 4, 8 y 12 semanas post inyección) se procedió a ingresarlos en la herramienta de “análisis de datos” que presenta Microsoft Excel tal como lo indican la Figuras 3.6 y luego en la selección de “generación de

números aleatorios ‘como lo muestra la Figura 3.7. Se debe considerar, además, que la distribución de los datos se determinó de características Normal.

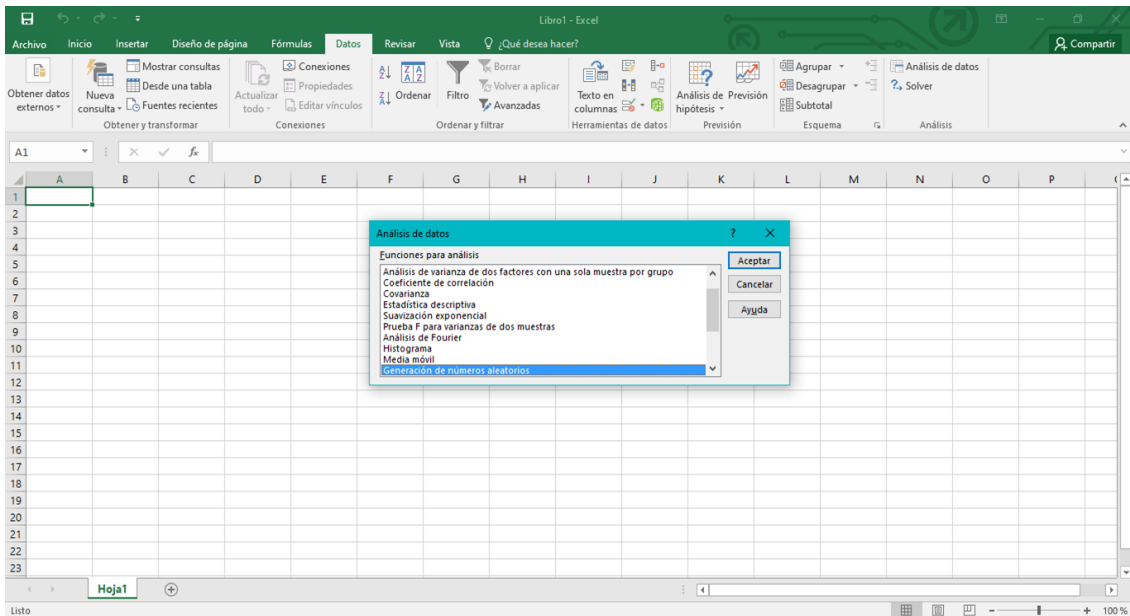


FIGURA 3. 6: Visualización de Microsoft Excel con la herramienta de análisis de datos utilizados en esta investigación.

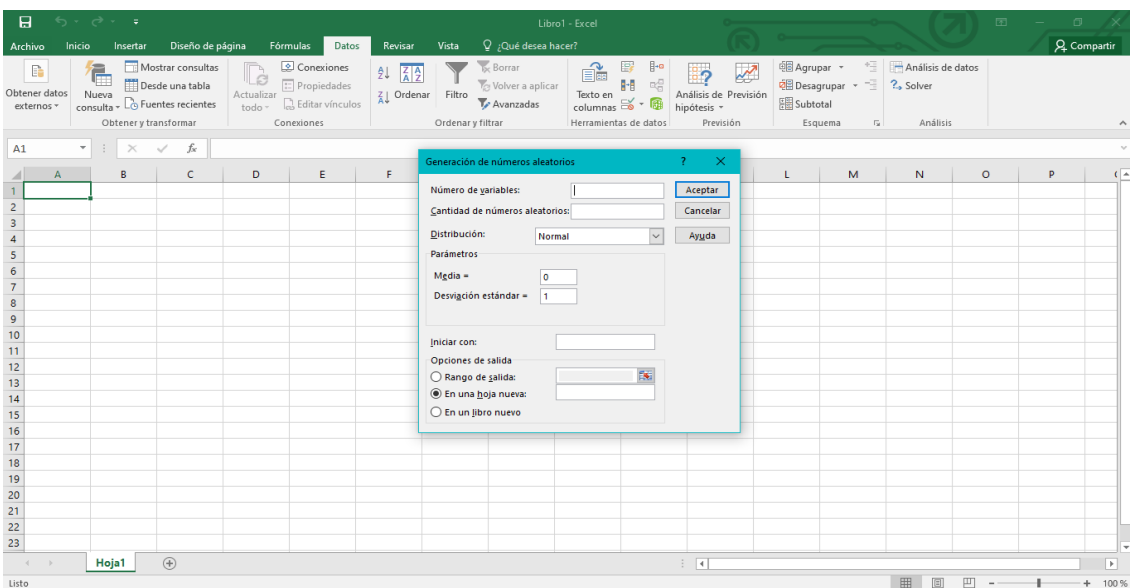


FIGURA 3. 7: Visualización de Microsoft Excel con la herramienta de generación de datos utilizada para obtener los valores simulados de las variables de esta investigación.

3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos son expresados como media \pm desviación estándar. Se aplicó el test de Shapiro Wilk y $p < 0,05$ para considerarlo estadísticamente significativo. Para realizar la comparación entre los grupos en los distintos tiempos se utilizó el test ANOVA de dos vías con comparaciones múltiples y posteriormente la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. Todos los análisis estadísticos de los datos fueron realizados con el software Graph Pad Prism versión 8.0.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

De acuerdo a las características de esta investigación en que no se permite la pérdida de sujetos, todos los resultados presentados a continuación responden a un total de 72 animales, siendo 36 controles y 36 diabéticos, tal como se describió anteriormente.

4.1 GLICEMIAS

Al momento del sacrificio, las glicemias de las ratas del grupo control fue en promedio $133.27 \pm 10,83$ mg/dl y de las ratas diabéticas de 513.06 ± 14.11 mg/dl (media \pm SD). Durante todo el experimento se mantuvo una diferencia significativa entre los grupos control y diabéticos con $p < 0.001$. Los valores de glicemias de cada uno de los tiempos se muestran en la Tabla 4.1.

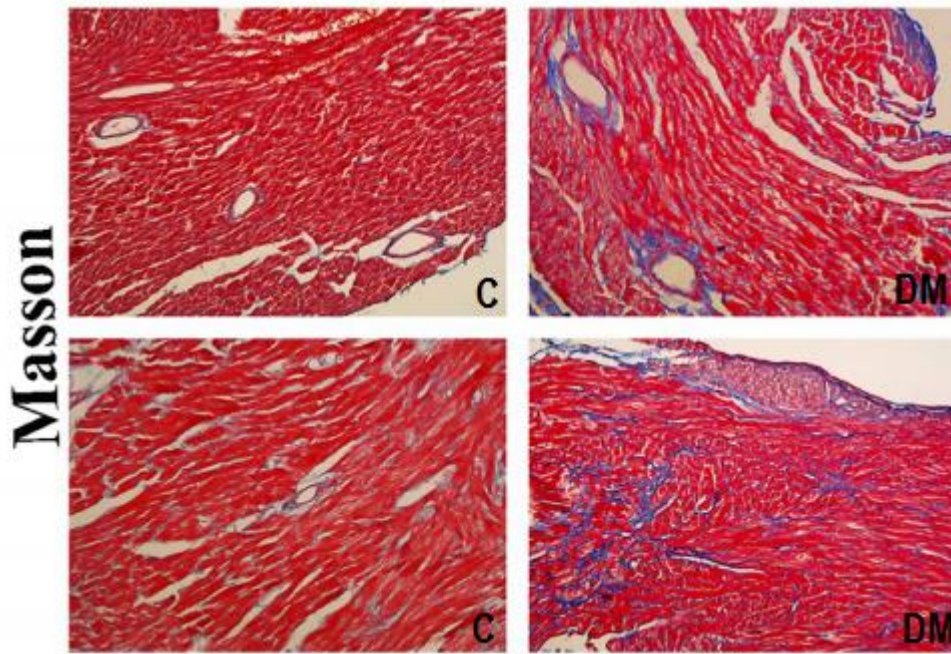
*TABLA 4 1: Glicemias en mg/dL de cada semana para el grupo control y diabético. Cada grupo corresponde a un n=9. *p<0.001 vs grupo control. ANOVA de dos vías.*

Glicemias (mg/dL)		
Semana	Control	Diabéticas
2	$132,61 \pm 9,37$	$503,80 \pm 16,14^*$
4	$132,25 \pm 11,26$	$533,92 \pm 21,04^*$
8	$134,41 \pm 11,20$	$504,77 \pm 5,03^*$
12	$133,81 \pm 11,51$	$509,75 \pm 14,23^*$

4.2 VISUALIZACIÓN DE TÉCNICAS

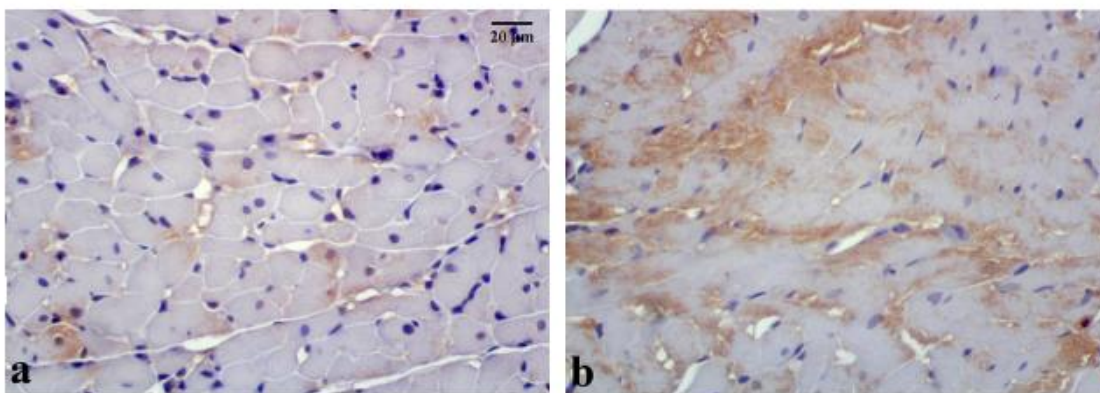
Con el objetivo de acercar al lector a los resultados experimentales, a continuación, se incorporan a modo de referencia, algunas de las imágenes de los artículos utilizados o estandarizaciones en cuanto a la técnica Tricrómico de Masson, inmunohistoquímica de caspasa-3-activada y Beclin-1.

En cuanto a la aplicación de la técnica histoquímica de Tricrómico de Masson, se esperaba observar los depósitos de colágeno de coloración azul, tanto de forma intersticial como perivascular, además del tejido muscular conservado con posible hipertrofia de células miocárdicas (Figura 4.1).



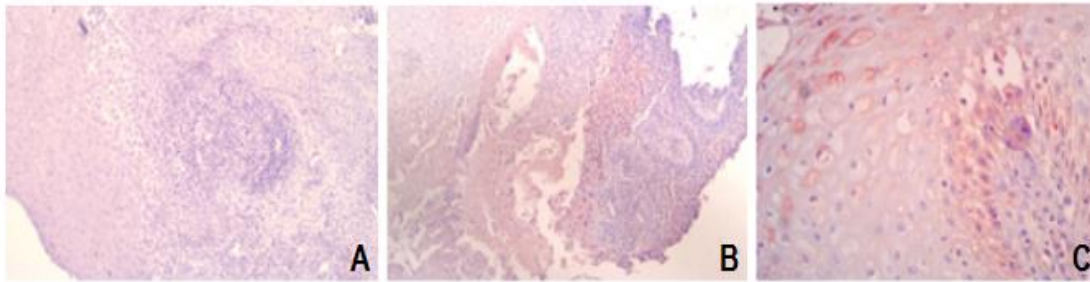
*FIGURA 4. 1: Miocardio de ratón C57BL/6J con la tinción de tricrómico de Masson en una escala de 50 μ m, en **C** los cortes control y en **DM** los cortes de ratones diabéticos. Modificado de (102).*

En el caso de la inmunohistoquímica de caspasa-3-activada, la marcación se observaría en el citoplasma celular, con patrón de positividad en parches variando su intensidad (Figura 4.2).



*FIGURA 4. 2: Miocardio de ratas macho Sprague-Dawley con la aplicación de la técnica inmunohistoquímica para caspasa-3-activada, donde se observa en **a** la rata control y en **b** el marcaje en la rata diabética, ambas imágenes en una escala de 20 μ m. Modificado de (95).*

Por otra parte, el marcador autofágico Beclin-1, también corresponde a una marcación citoplasmática con un patrón de positividad en parches de menor tamaño y con diferencia en su intensidad al igual que con caspasa-3-activada (Figura 4.3).



*FIGURA 4. 3: Microfotografías tomadas en el laboratorio de ciencias morfológicas de la Universidad de Valparaíso al momento de estandarizar el anticuerpo Beclin-1, corresponden a muestras de cáncer cervicouterino ocupado como control de la técnica. Se observa en **A** el tejido control en 10 X y en **B** y **C** con la inmunomarcación en 10X y 40X respectivamente. Contraste realizado con Hematoxilina.*

4.3 PORCENTAJE DEL ÁREA DE FIBROSIS

En cuanto al porcentaje de fibrosis, al comparar las ratas control con las diabéticas, se obtuvieron valores con significancia estadística en los cuatro tiempos de sacrificio con $p < 0.0001$. En el grupo control los datos alcanzaron, en la semana 2, un valor de $0.68 \pm 0.12\%$, en la semana 4 de $0.73 \pm 0.16\%$, en la semana 8 de $0.74 \pm 0.18\%$ y en la semana 12 de $1.48 \pm 0.22\%$, mientras que el grupo diabético alcanzaron valores de $5.19 \pm 0.33\%$, $5.10 \pm 0.32\%$, $5.37 \pm 0.25\%$, $12.52 \pm 0.96\%$ para 2, 4, 8 y 12 semanas post- inyección, respectivamente.

Por otra parte, al comparar los valores obtenidos entre ratas diabéticas, se observó una diferencia entre la semana 2, 4 y 8 en relación a la semana 12 ($p < 0.0001$), sin embargo, entre los tres tiempos iniciales no se detectaron diferencias estadísticamente significativas. Este mismo fenómeno no fue observado entre los grupos control.

Además, cabe mencionar que entre ratas control existen diferencias con significancia estadística entre la semana 2 y la 12 de 0.80% ($p = 0.0021$), 4 y 12 de 0.75% ($p = 0.0048$) y entre las semanas 8 y 12 de 0.75% ($p = 0.0051$).

Lo descrito anteriormente se muestra en la Figura 4.4.

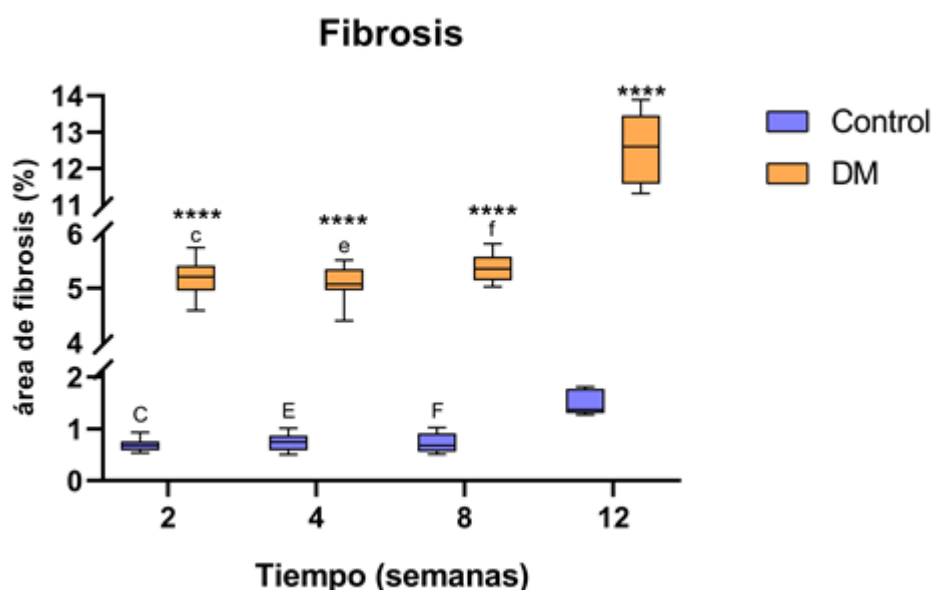


FIGURA 4. 4: Gráfico de caja y bigotes correspondiente a la cuantificación porcentual de fibrosis miocárdica, evidenciable tras la aplicación de la técnica tricrómico de Masson. En azul se muestra las ratas control y en naranja las ratas diabéticas en cada una de las semanas de sacrificio post- inyección. **** $p < 0.0001$ versus Control. c/e/f $p < 0.0001$ versus 12DM. C/E/F $p = 0.0021/p = 0.0048/p = 0.0051$, respectivamente, versus 12C. ANOVA de dos vías.

4.4 PORCENTAJE DEL ÁREA DE INMUNOMARCACIÓN DE APOPTOSIS

Respecto al porcentaje de área de inmunomarcación del anticuerpo caspasa-3 activada, entre los grupos control y DM se evidenció una diferencia significativa en todos los tiempos ($p < 0.0001$). Estas diferencias control v/s DM son: $4.79 \pm 0.50\%$ v/s $16.28 \pm 0.68\%$ (semana 2), $4.98 \pm 0.64\%$ v/s $22.26 \pm 1.31\%$ (semana 4), $5.47 \pm 0.52\%$ v/s $29.22 \pm 0.60\%$ (semana 8) y finalmente, $5.06 \pm 0.55\%$ v/s $34.83 \pm 1.35\%$ (semana 12), respectivamente (Figura 4.5).

Entre los grupos de ratas diabéticas se observó un aumento del porcentaje de inmunomarcación desde la semana 2 hacia la 12, existiendo una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre cada uno de los tiempos (2, 4, 8 y 12 semanas), siendo la mayor diferencia entre la semana 2 y 12 correspondiente a un 18.55%, seguida por la diferencia entre la semana 2 y 8 con un 12.94%.

No hay diferencias estadísticas entre controles en ninguno de los tiempos.

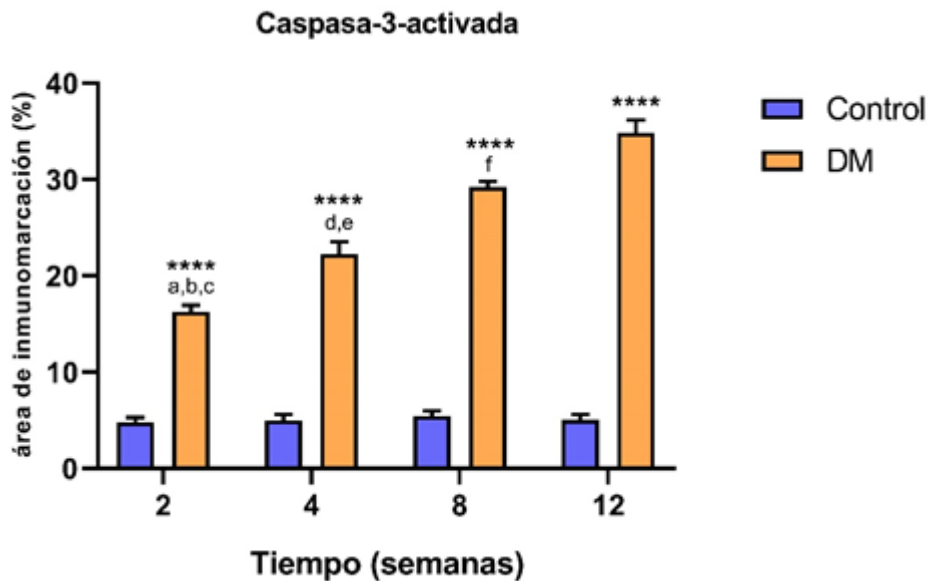


FIGURA 4. 5: Gráfico del área de inmunomarcación en el miocardio de ratas con el anticuerpo caspasa-3-activada, utilizado como indicador de muerte celular mediante apoptosis. Se observa un incremento gradual del porcentaje de inmunomarcación en los grupos diabéticos. **** $p < 0.001$ versus Control. a/b/c/d/e/f $p < 0.0001$ versus DM en cada uno de los tiempos. ANOVA de dos vías.

4.5 PORCENTAJE DEL ÁREA DE INMUNOMARCACIÓN PARA AUTOFAGIA

En el estudio del porcentaje de inmunomarcación con el anticuerpo para Beclin-1, se observó mayor inmunomarcación en los controles que en los animales diabéticos. Por otra parte, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.0001$) entre controles y DM en todos los tiempos, siendo los valores del grupo control para la semana 2 ($16.96 \pm 0.99\%$), semana 4 ($18.32 \pm 1.26\%$), semana 8 ($18.05 \pm 1.57\%$) y semana 12 ($17.96 \pm 1.25\%$), mientras que el grupo diabético alcanzó valores de $8.97 \pm 0.46\%$; $7.48 \pm 0.22\%$; $6.47 \pm 0.34\%$; $5.40 \pm 0.28\%$ para cada semana respectivamente (Figura 4.6).

Además, entre los grupos diabéticos solo hay diferencias estadísticas entre 2DM y los otros tres tiempos, siendo $p = 0.0264$ al compararse con 4DM y $p < 0.0001$ en relación a 8DM y 12DM; también existe una diferencia entre el grupo 4DM y 12DM ($p = 0.0004$).

No hubo diferencias estadísticamente significativas entre controles para ninguno de los tiempos.

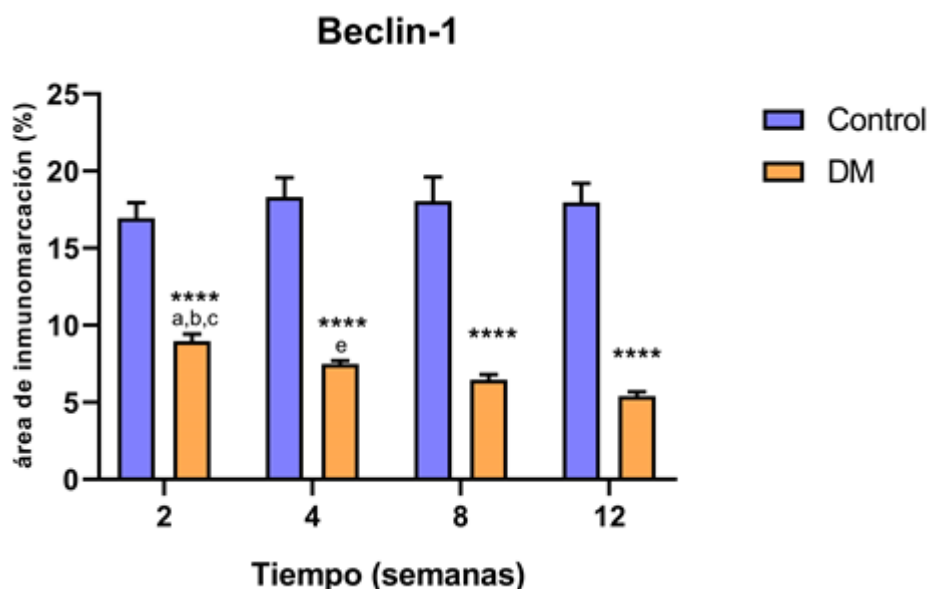


FIGURA 4. 6: Gráfico del porcentaje del área de inmunomarcación en miocardio de ratas control y DM con el anticuerpo para Beclin-1, utilizado como indicador de muerte celular por autofagia. **** $p < 0.0001$ versus Control. a $p = 0.0264$ versus 4DM. b/c $p < 0.0001$ versus 8DM/12DM, respectivamente. ANOVA de dos vías.

4.6 INTENSIDAD DE INMUNOMARCACIÓN PARA APOPTOSIS

En cuanto a la intensidad de la inmunomarcación del anticuerpo caspasa -3-activada, se estableció una diferencia significativa entre los controles y los grupos diabéticos, solo en la semana 8 y 12, en ambos casos con $p < 0.0001$. Para la semana 8 los valores fueron de 0.44 ± 0.06 u en el control y 0.96 ± 0.10 u el diabético, mientras que en la semana 12 fueron de 0.29 ± 0.04 u para el control y 1.28 ± 0.27 u para el diabético (Figura 4.7).

Por otra parte, entre el grupo diabético, si bien se aprecia un aumento en la intensidad de inmunomarcación, se arrojaron resultados con significancia estadística ($p < 0.0001$) entre la semana 2DM (0.54 ± 0.03 u) y la semana 4DM (0.64 ± 0.07 u) en relación a la semana 12DM (1.28 ± 0.27 u), además de una diferencia entre del 8DM (0.96 ± 0.10 u) con el 12DM ($p = 0.0002$). A su vez, el grupo 2DM es estadísticamente significativo al compararlo con el 8DM ($p < 0.0001$), al igual que el grupo 4DM con el 8DM ($p = 0.0003$).

En el caso de los controles, se aprecia una disminución en la intensidad de marcación inmunohistoquímica, existiendo diferencias significativas entre 2C (0.28 ± 0.17) y 8C con un valor $p=0.0157$, 2C y 12C ($p<0.0001$), 4C (0.69 ± 0.19) con 8C ($p=0.0117$) y 12C ($p<0.0001$).

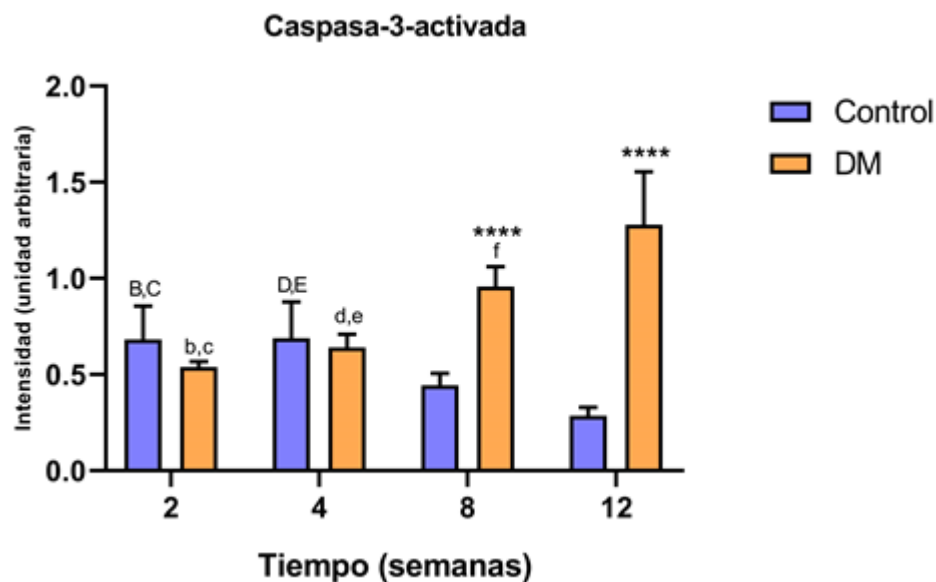
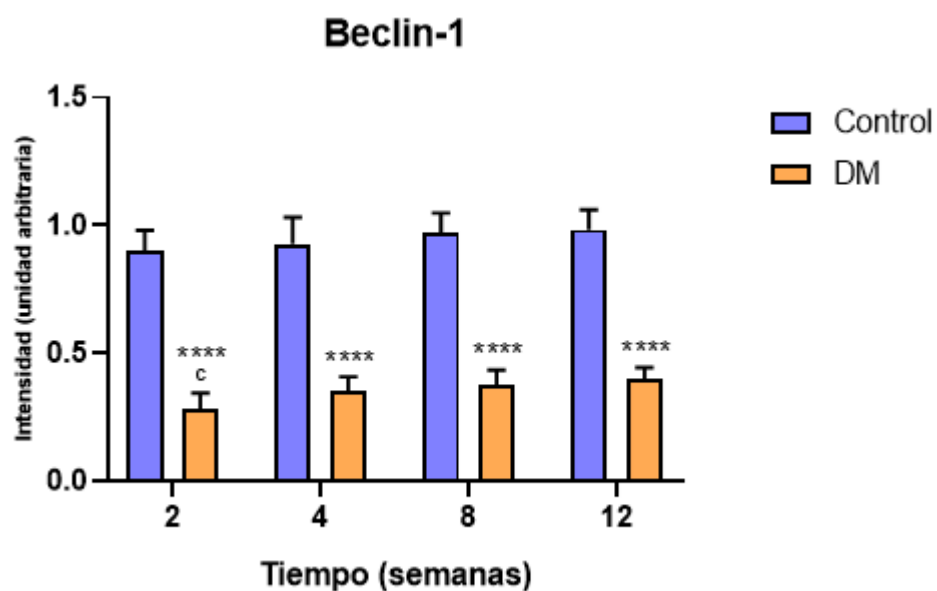


FIGURA 4. 7: Gráfico de la intensidad de inmunomarcación en el miocardio de ratas controles y DM, para el anticuerpo caspasa-3-activada como indicador de muerte celular por apoptosis. **** $p<0.0001$ versus DM. b/c $p<0.0001$ versus 8DM/12 DM, respectivamente. d $p=0.003$ versus 8DM. e/f $p<0.0001/p=0.0002$ versus 12 DM, respectivamente. B $p=0.0157$ versus 8C. C $p<0.0001$ versus 12C. D $p=0.0117$ versus 8C. E $p<0.0001$ versus 12C. ANOVA de dos vías.

4.7 INTENSIDAD DE INMUNOMARCACIÓN PARA AUTOFAGIA

Respecto a la intensidad de inmunomarcación del anticuerpo Beclin-1, se muestra una mayor intensidad en los grupos controles que en los diabéticos. Las diferencias estadísticas se presentan entre los animales control y DM ($p<0.0001$) en cada uno de los tiempos, siendo 2C $0.90\pm 0.08u$ y 2 DM $0.28\pm 0.07u$; 4C $0.93\pm 0.10u$ y 4DM $0.35\pm 0.05u$; 8C $0.97\pm 0.08u$ y 8DM $0.37\pm 0.06u$; 12C $0.98\pm 0.08u$ y 12DM $0.40\pm 0.05u$ (Figura 4.8).

Por otro lado, en la comparación entre el grupo diabético existió una diferencia significativa entre 2DM y 12DM con $p=0,0196$. Entre controles no hubo diferencias significativas en ninguno de los tiempos.



*FIGURA 4. 8: Gráfico de la intensidad de inmunomarcación en el miocardio de ratas control y DM para el anticuerpo Beclin-1 utilizado como indicador de muerte celular por autofagia. **** $p < 0.0001$ versus Control. c $p = 0.0196$ versus 12DM. ANOVA de dos vías.*

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN

Como se ha descrito con anterioridad, la MCD es una patología que afecta a un número importante de pacientes diabéticos, en quienes las complicaciones cardiacas son grandes responsables de la morbilidad y mortalidad (103). Dentro de los diversos mecanismos fisiopatológicos que generan daño cardiaco en este estado de hiperglicemia están la fibrosis, apoptosis y autofagia, por lo que este proyecto las estudió durante un curso temporal.

En primer lugar, se debe considerar que para obtener estos resultados simulados se debió trabajar en base a diversas investigaciones previas en donde los modelos diabéticos murinos varían entre ratones y ratas, y en la dosis de STZ aplicada. Se consideraron artículos científicos que trabajaron con modelos biológicos de ratones y ratas, si bien ambos modelos son ampliamente utilizados en investigación por su versatilidad, presentan algunas diferencias anatómicas evidentes (104), sin embargo, como modelos diabéticos responden con la misma efectividad, ya sea modificados genéticamente o por inducción química a través de Aloxano y/o STZ, ambos considerados como potentes fármacos diabetogénicos (105). Además, el rango de la dosis de STZ considerado en esta investigación fue de 50-70 mg/kg para ratas adultas, lo que es idóneo y respaldado por un estudio que planteó la relación dosis-respuesta que existe utilizando este antibiótico, comparando la efectividad entre tres dosis distintas (33 mg/Kg, 50 mg/kg y 75 mg/kg) concluyendo finalmente que en los primeros cinco días post-inyección con una dosis mínima de 50mg/kg se evidenciaba el daño generado por procesos inflamatorios en diversos órganos como hígado, riñón y páncreas, con una pérdida mínima de ratas (106). Por lo anterior, los valores de glicemias obtenidos en esta investigación, 133.27 mg/dl para los controles y 513.06 mg/dl para los DM, se consideran válidos y experimentalmente se podrían esperar resultados similares en modelos murinos.

Por otra parte, en cuanto a fibrosis, se confirma lo reportado por otros autores al constatar un aumento en los depósitos de colágeno en el miocardio diabético en comparación a los animales control (98,107,108,109,110,111). Al estudiar este componente a través del tiempo (semanas), fue posible evidenciar que en dicho incremento existe un momento clave con un crecimiento súbito al presentarse el estado diabético crónico, es decir, de acuerdo a Xichun Yu et al (112), hacia las 12 semanas tras la inyección de SZT. Esta alza en los niveles de fibrosis puede asociarse con el progreso de otros eventos metabólicos característicos de la MCD, como la acumulación de sorbitol y ROS (113,114), el estrés oxidativo (incrementando ROS) y procesos inflamatorios (103), acumulación de AGE's, hiperglicemia (114), entre otros.

Aunque establecer una relación temporal entre la fibrosis y los elementos mencionados no es objetivo de este proyecto, la variedad de mecanismos que se han relacionado con esta alteración de los componentes de la matriz extracelular (MEC), permite resaltar la transversalidad del progreso fibrótico en el desarrollo de la MCD, por lo tanto, su visualización en los modelos diabéticos podría constituir una guía para comprender la temporalidad de otros procesos fisiopatológicos menos estudiados. De acuerdo a lo anterior, es de esperar que el aumento de los depósitos de colágeno sea uno de los elementos más estudiados en la MCD logrando establecerlo como uno de los mecanismos clásicos de daño en el corazón diabético (95,114).

Cabe mencionar, además, que se ha descrito con anterioridad la relación existente entre la fibrosis intersticial con la hipertrofia de las células miocárdicas en pacientes diabéticos (52). Por las características de esta investigación no fue posible evidenciar este evento, sin embargo, estos cambios histopatológicos y el grado de la disfunción ventricular podrían ser materia de discusión para futuros estudios.

En cuanto a la muerte de las células cardiacas, previamente algunos autores han mencionado que el proceso de apoptosis podría corresponder a un mecanismo fundamental en el desarrollo de la MCD (115,116,117,118). Nuestra investigación logró evidenciar que, mediante la técnica inmunohistoquímica aplicada en miocardio diabético, existe un aumento en la marcación de caspasa-3-activada, proteína ejecutora de la apoptosis cuya importancia radica en su interacción con caspasas iniciadoras tanto de la vía extrínseca como intrínseca (65), lo que concuerda con lo reportado por otros autores donde la proteína aumenta en ratas diabéticas inducidas por STZ (71,88). Si bien, en gran parte de las investigaciones revisadas no se utiliza regularmente técnicas inmunohistoquímicas para evidenciar este fenómeno, sí ocurre con técnicas empleadas (PCR, ensayo TUNEL y Western Blot) tanto para caspasa-3-activada (56,85), como para otros marcadores apoptóticos (85,112) cuyos resultados son concordantes con este incremento de la muerte de los cardiomiocitos en los sujetos diabéticos.

Por otro parte, las diferentes temporalidades de nuestro estudio hicieron posible visualizar que esta alza en la marcación apoptótica es sostenida en el tiempo, alcanzado su mayor nivel de incremento en la semana 12, representando un 32% aproximadamente de área marcada, sin embargo, para determinar que este momento es el punto máximo durante la MCD, se hace necesario estudiar el fenómeno en etapas más avanzadas, es decir, tras las 12 semanas post inyección.

De acuerdo a la literatura la hiperglicemia por sí sola es un factor de riesgo que se relaciona directamente con el daño cardiaco y la MCD, en que los cardiomiocitos sufren diversas alteraciones que desencadenan su apoptosis (85,113), activando ambas vías apoptóticas como consecuencia de esta hiperglicemia, el aumento de ROS, lipotoxicidad y otros factores patológicos (56,71), condicionando a estos cardiomiocitos a procesos de remodelamiento cardiaco y eventualmente a la pérdida de sus funciones (71). Considerando lo anterior, la gran magnitud de nuestros resultados en relación al área de apoptosis de los grupos diabéticos que obtuvieron glicemias no inferiores a 500 mg/dL, no son sorprendidos.

En cuanto al proceso de autofagia, donde se genera una vacuola lisosomal para la degradación de diversos elementos y que requiere la activación de la proteína Beclin-1 para su inicio (82), la menor área de inmunomarcación de Beclin-1 en las ratas diabéticas se condice con otros estudios de biología molecular tanto para la proteína mencionada (116), como para otras proteínas autofágicas (112). Es importante mencionar que la bibliografía en relación al comportamiento de Beclin-1 es dispar (50,81,119), sin embargo, de acuerdo a lo descrito por Lavandero et. (81) este mecanismo de muerte celular estaría inhibido en condiciones patológicas como la DM, avalando la baja de éste desde la semana 2. Además, se plantea que el proceso autofágico actuaría como un mecanismo de cardioprotección en el corazón diabético (112,115). Si bien nuestros resultados son acordes a esta idea, podrían sugerir que durante el desarrollo de la MCD este proceso inicialmente actúa como un agente protector, pero se ve disminuido al ser insuficiente para contrarrestar el daño cardiaco, desencadenando el aumento de la marcación apoptótica. El incremento de la apoptosis y la disminución de la autofagia ya ha sido reportado por otros autores mediante análisis moleculares en modelos diabéticos y se ha planteado que la interacción entre Beclin-1 y la proteína Bcl-2, proteína que en interacción con Beclin-1 inhibe la autofagia (80), jugaría un rol clave en este evento, proponiendo la disociación de los elementos como mecanismo de inhibición de la apoptosis y estimulación de la autofagia (112,116).

Del mismo modo, existen estudios moleculares que presentan resultados contradictorios en los niveles de otras proteínas que participan en el mecanismo de autofagia (119,120,121), es decir, en algunos casos se ha observado aumentada (122) y en otros disminuida (101,115) (123), e incluso se menciona que la autofagia actuaría distinta en la DM1 y la DM2 (112,124). Se debe considerar que estas diferencias se generan al estudiar diversos modelos diabéticos, tales como inyecciones de STZ en ratas, ratones, ratones OVE26, ratones db/db, entre otros,

lo que sugiere que el comportamiento de este mecanismo sería dependiente del modelo utilizado para la inducción diabética.

A su vez, se ha recomendado estudiar la autofagia mediante su flujo y no solamente un eslabón de la vía, para evitar confusiones en relación a si la acumulación de autofagosomas corresponde a un incremento de la autofagia o defectos de degradación y/o crecimiento (119). En esta investigación, si bien la limitación está presente, en un futuro proyecto se pretende corregirlas al estudiar otras proteínas autofagias como mTOR, PI3K, LC3 [LACII/LC3I], ATG-5 y ATG-7.

De acuerdo a todo lo planteado anteriormente, nos parece un error asegurar que nuestros resultados son concluyentes sin estar establecido un modelo base de trabajo que permita comparar este fenómeno en igualdad de condiciones, por lo que se hace necesario realizar aún más estudios que permitan dilucidar el comportamiento más acertado de este mecanismo o bien que permitan comprender a cabalidad los diversos factores que afectan a la autofagia y que repercuten en los resultados.

Por otra parte, al realizar estudios en distintas temporalidades, es posible sugerir que el inicio del desarrollo de la MCD corresponde al momento crítico para la acción terapéutica en relación a la apoptosis y la fibrosis, debido a que hacía las semanas finales, la magnitud de ambas variables pareciera presentar un comportamiento difícil de contrarrestar, aún más considerando la cantidad de disfunciones metabólicas que se han asociado a la patología y que interaccionan entre sí. De acuerdo a lo anterior, Zhang et al. y Wang et al. plantean que el aumentar la autofagia para disminuir la fibrosis y la apoptosis podría considerarse como una opción terapéutica viable (112,125), mientras que Zhao et al. sugiere que el enfoque estaría en la reducción del estrés oxidativo como condición fundamental en la prevención del desarrollo patológico al favorecer la autofagia (115).

De acuerdo a nuestras observaciones, aún no es posible establecer la autofagia como blanco terapéutico dado que no se ha podido dilucidar el comportamiento real durante la MCD, por el contrario, consideramos que disminuir tanto la apoptosis como la fibrosis podrían representar un objetivo válido para contrarrestar el daño como tal.

Finalmente, debemos mencionar que la intensidad de inmunomarcación fue un punto crítico en la investigación, donde la escasa información de publicaciones científicas que utilizan una medición cuantitativa de la intensidad, nos sugiere que este estudio podría ser pionero en

definir su utilidad tanto con la inmunomarcación de caspasa-3-activada como para Beclin-1. Este método de cuantificación se basa en la intensidad recíproca que se pudiera generar desde el cromógeno en una zona determinada permitiendo verificar la concentración de antígenos en una zona específica (126) de esta forma, al utilizarlo se evitan métodos de inmunofluorescencia que puedan ser más costosos y se eliminan las discrepancias de los observadores al aplicar la escala de tres equis.

En cuanto a lo obtenido con la intensidad de caspasa-3-activada se observó un incremento desde la semana 2 a la 12 en ratas diabéticas, estableciéndose una relación directamente proporcional entre el porcentaje de inmunomarcación y su intensidad a través del tiempo, es decir, además de aumentar el área de apoptosis, aumenta la cantidad de la proteína apoptótica caspasa-3-activada. Estos resultados se respaldan en cuantificaciones realizadas con la técnica de Western Blot, donde la cantidad de la proteína aumenta en modelos con diabetes (127).

Por otro lado, con Beclin-1 no se observaron variaciones de intensidad entre los grupos diabéticos, pero sí se observó menor intensidad que en las ratas controles, lo que se respalda con lo demostrado por otros autores con la técnica de Western Blot en que se mantiene la disminución de abundancia de esta proteína en la patología diabética (115,123,128).

Es importante destacar que esta investigación presenta diversas limitaciones, una de ellas y con mayor relevancia fue la falta de visualización de un completo panorama del corazón por cada una de las zonas planteadas experimentalmente. Esto afectó directamente al estudio de intensidad ya que no se pudo observar las variaciones de esta variable ni su localización, impidiendo obtener esta valiosa información que nos permitiera ahondar más en su utilidad. Además, considerando que la mayoría de las investigaciones utilizan solo un corte de miocardio, ya que contempla aproximadamente un 75% del volumen de las células cardiacas (52), el observar tres zonas distintas aportaría aún más información, no sólo en cuanto a la intensidad de inmunomarcación, sino también en muerte celular y fibrosis. En relación a esta última, se ha planteado que existiría un aumento de fibrosis en las zonas auriculares del corazón (39), pero al verse truncada esta línea investigativa no se pudo dilucidar.

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Frente a lo planteado anteriormente, el realizar un estudio con distintas temporalidades permitió conocer que la fibrosis sigue siendo el componente con mayor evidencia reportada, y por ende entender su mecanismo e interacción con otros eventos fisiopatológicos es clave para ampliar el entendimiento de la MCD.

Por otra parte, en cuanto a la muerte celular por apoptosis, se concluye que corresponde a un mecanismo fundamental en la progresión patológica, mientras que, en el caso de la autofagia, ésta podría tener un rol aún más importante de lo planteado, aunque sigue siendo incierto, haciendo necesario realizar más investigaciones para su total entendimiento.

A su vez, la utilización de la técnica inmunohistoquímica en conjunto con el estudio cuantitativo de intensidad, permitiría obtener una perspectiva más amplia de la distribución de las proteínas de interés en el tejido miocárdico como de su cantidad, por ende, amplificar su uso aportaría información relevante para el conocimiento del comportamiento autofágico y apoptótico.

Finalmente, si bien este proyecto abordó cuatro tiempos distintos (2, 4 , 8 y 12 semanas) profundizar en etapas más avanzadas del desarrollo patológico permitirá tener un panorama mucho más amplio del comportamientos de los elementos estudiados; además, si se logra confirmar que la apoptosis y la autofagia actúan de forma opuesta, se presenta una nueva perspectiva fisiopatológica generando aún más interrogantes que requerirán más investigación que permitan concretarlos o no como una opción terapéutica importante.

CAPÍTULO 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Peate I, Muralitharan N. Anatomía y fisiología para enfermeras [Internet]. Primera ed. Guerra O, editor. Ciudad de México; 2017. Available from: file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc_o_00042_01.pdf
2. Flores V. Embriología humana [Internet]. primera. Buenos Aires; 2015. 1–575 p. Available from: file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc_o_00042_01.pdf
3. Olave E, Torrez JC, Riquelme N, Ibacache L, Binvignat O. Peso del corazón y pulmones en relación al sexo, grupo étnico, edad e índice de masa corporal en individuos chilenos. *Int J Morphol*. 2014;32(3):866–70.
4. Tortora G, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología [Internet]. 13th ed. Madrid; 2006. Available from: https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_Aduyadej's_Funeral.pdf
5. Kierszenbaum A, Tres L. Histología y biología celular [Internet]. 3rd ed. Vol. 11, *Journal of Visual Languages & Computing*. Barcelona; 2012. Available from: https://www.m-culture.go.th/mculture_th/download/king9/Glossary_about_HM_King_Bhumibol_Aduyadej's_Funeral.pdf
6. Young B, O'Dowd G, Woodford P. Wheater Histología funcional: texto y atlas en color. sexta. Vol. 4. Barcelona; 2014. 1–413 p.
7. Lewis R, Downes N. Anatomy and histology of the laboratory rat in toxicology and biomedical research. London: Andre Gerhard Wolff; 2019. 1–359 p.
8. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Patología Estructural y Funcional. 9th ed. Barcelona: Elsevier Inc.; 2015. 1105 p.
9. Hall JE, Guyton AC. Tratado de fisiología médica. 12th ed. Barcelona: Elsevier Inc.; 2011.
10. Sanchez G. Historia de la diabetes. *Gac médica Boliv*. 2007;74–8.
11. Chiquete E, González N, Cerda P. Perspectiva histórica de la diabetes mellitus. *Comprendiendo la enfermedad. Investig en Salud*. 2001;III(99):5–10.
12. Reinauer H, Home P, Kanagasabapathy A, Heuck C-C. Diagnóstico y monitorización de la Diabetes Mellitus desde el laboratorio. Madrid; 2005.
13. Brusco H, López JJ, Loidll C. Histología médico-práctica [Internet]. primera. Barcelona; 2014. Available from: file:///C:/Users/youhe/Downloads/kdoc_o_00042_01.pdf
14. Grossman S, Porth CM. Fisiopatología. 9th ed. Wolters Kluwer Health, Lippincott Williams & Wilkins., editors. Barcelona; 2014.
15. Pérez C, Guerrero C. Mecanismos moleculares por los cuales los ácidos grasos podrían influir en la captación de glucosa. *Rev Fac Med Univ Nac Colomb*. 2005;53(2):91–8.
16. Arraiz N, Leal E, Linares S, Mengual E, Valdelamar L, Seyfi H, et al. Biología molecular de los transportadores de glucosa: clasificación, estructura y distribución. *Arch Venez Farmacol y Ter*. 2007;26(2):76–86.
17. Pérez M, Díaz-muñoz DDI, Díaz M. Gluconeogénesis: Una visión contemporánea de una vía metabólica antigua. *Rev Educ Bioquímica*. 2012;31(1):10–20.
18. Nuttall FQ, Ngo A, Gannon MC. Regulation of hepatic glucose production and the role of gluconeogenesis in humans: is the rate of gluconeogenesis constant? *Diabetes Metab Res Rev*. 2008;24:438–58.
19. Hatting M, Tavares CDJ, Sharabi K, Rines AK, Puigserver P. Insulin regulation of gluconeogenesis. 2019;1411(1):21–35.

20. Islas S, María R. Diabetes mellitus: actualizaciones. Paíz J, editor. Ciudad de México: Alfil S.A de C.V; 2013.
21. International Diabetes Federation. Atlas de la diabetes de la FID [Internet]. 9th ed. Atlas de la Diabetes de la FID. 2019. 1–169 p. Available from: http://www.idf.org/sites/default/files/Atlas-poster-2014_ES.pdf
22. Margarita D, Fernández A, Carlos F, Barrera C, Flora D, Simarro L, et al. Guías Clínicas. Diabetes mellitus. 2015.
23. Departamento de Epidemiología. Documento presentación primeros resultados Tercera Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017. Santiago; 2017.
24. Departamento de Epidemiología. Encuesta Nacional de Salud 2016-2017 Primeros resultados. Santiago; 2017.
25. Mathers CD, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *Plos Med.* 2015;3(11).
26. Candela JM. ¿Cuáles son los factores de riesgo para desarrollar diabetes mellitus tipo 2? 2015;16–8. Available from: <http://www.uptodate.com/contents/>
27. Paulweber B, Valensi P, Lindström J, Lalic NM, Greaves CJ, McKee M, et al. A European evidence-based guideline for the prevention of type 2 diabetes. *Horm Metab Res.* 2010;42(SUPPL. 1):3–36.
28. Fletcher B, Gulanick M, Lamendola C. Risk factors for type 2 diabetes mellitus. *J Cardiovasc Nurs.* 2002;16(2):486.
29. National Institute for Health and Clinical Excellence. Preventing type 2 diabetes: Risk identification and interventions for individuals at high risk. NICE Public Heal Guid [Internet]. 2012;(July):1–162. Available from: <http://guidance.nice.org.uk/PH38/Guidance/pdf/English>
30. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes—2017. *Clin diabetes J.* 2017;35(1):33–49.
31. Subsecretaría de Salud Pública. Guía Clínica AUGÉ: Diabetes Mellitos tipo 1. Santiago; 2013.
32. Domínguez C. Guía de práctica clínica de diabetes mellitus tipo 2. 2014;10(2):1–18.
33. Millán CO. Las otras complicaciones de la diabetes mellitus. *Diabetes Práctica.* 2014;5(3):97–144.
34. Garzón G, Gil Á, María A, Jiménez F, José M. Grado de control metabólico y de factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2 con y sin enfermedad cardiovascular. *Gac Sanit [Internet].* 2015;29(6):425–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gaceta.2015.07.010>
35. Emerging T, Factors R. Diabetes mellitus , fasting blood glucose concentration , and risk of vascular disease : a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies [Internet]. Vol. 375, *The Lancet.* Elsevier Ltd; 2010. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60484-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60484-9)
36. Chowdhry M, Vohra H, Galiñes M. Diabetes increases apoptosis and necrosis in both ischemic and nonischemic human myocardium : Role of caspases and poly – adenosine diphosphate – ribose. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;134(1):5–7.
37. Gary F. Diabetic cardiomyopathy : fact or fiction ? *Heart.* 2001;85:247–8.
38. Ampudia-blasco FJ, Navarro J. Enfermedad cardiovascular en la diabetes mellitus. *Med Clin (Barc) [Internet].* 2002;118(8):306–11. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753\(02\)72367-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0025-7753(02)72367-1)
39. Seferović PM, Paulus WJ. Clinical diabetic cardiomyopathy: A two-faced disease with restrictive and dilated phenotypes. *Eur Heart J.* 2015;36(27):1718–27.
40. Vera NC, Estany ER, Ruiz MA. Miocardiopatía Diabética , lo que hoy conocemos. *Rev Cuba Cardiol y Cirugía Cardiovasc.* 2018;24(1).

41. Ashrafi R, Davis G. Cardiomyopathy in diabetics : a review of current opinion on the underlying pathological mechanisms. *Av en Diabetol.* 2011;27(5):175–81.
42. Gil I, Kaski JC. Miocardiopatía diabética. *Med Clin (Barc)* [Internet]. 2006;127(15):584–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1157/13094003>
43. Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic cardiomyopathy: An update of mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ Res.* 2018;122(4):624–38.
44. Aníbal J, Carabetti M. Cardiomiopatía diabética. *Rev Uruguaya Cardiol.* 2017;32(3):264–76.
45. Gilca GE, Stefanescu G, Badulescu O, Tanase DM, Bararu I, Ciocoiu M. Diabetic Cardiomyopathy: Current Approach and Potential Diagnostic and Therapeutic Targets. *J Diabetes Res.* 2017;2017:1–7.
46. Manjarrez G, Hernández V, Neri T, Boyzo A, Mondragón J, Hernández J. Hallazgos anatomopatológicos durante el desarrollo de la miocardiopatía diabética en la rata. *Cir Cir.* 2014;82(1):11–9.
47. Asghar O, Al-Sunn A, Khavandi K, Khavandi A, Withers S, Greenstein A, et al. Diabetic cardiomyopathy. *Clin Sci.* 2009;116:741–60.
48. Borghetti G, Von Lewinski D, Eaton DM, Sourij H, Houser SR, Wallner M. Diabetic cardiomyopathy: Current and future therapies. Beyond glycemic control. *Front Physiol.* 2018;9:1–15.
49. Navarro J, Fornieri MV. Cardiomiopatía diabética: entidad poco conocida y el impacto terapéutico de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el miocardio diabético. *Rev Clínica la Esc Med UCR-HSJD.* 2019;9(1):11–27.
50. Bhattacharya D, Mukhopadhyay M, Bhattacharyya M, Karmakar P. Is autophagy associated with diabetes mellitus and its complications? A review. *EXCLI J.* 2018;17:709–20.
51. Saldarriaga C, Navas V, Morales C. De la diabetes a la insuficiencia cardiaca ¿Existe la miocardiopatía diabética? *Rev Colomb Cardiol* [Internet]. 2020;27:12–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.rccar.2019.12.006>
52. Codinach Huix P, Freixa Pamias R. Miocardiopatía diabética: concepto, función cardiaca y patogenia. *An Med Interna.* 2002;19(6):313–20.
53. An D, Rodrigues B. Role of changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 2006;291(4).
54. Ferranti A, Garza G, Bátiz J, Martínez G, De la Garza F, Martínez HR, et al. Metaloproteinasas de la matriz extracelular y su participación en el proceso de cicatrización. *Rev Médicas UIS.* 2017;30(3):55–62.
55. Carvajal G, Zamudio P, Carvajal E. Prevención de los daños producidos por la diabetes mellitus y la senescencia. *Gac Med Mex.* 2007;143(1):51–9.
56. Baraka A, Abdelgawad H. Targeting Apoptosis in the Heart of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2010;15(2):175–81.
57. Costas MA, Rubio MF. Autofagia, una estrategia de supervivencia celular. *Medicina.* 2017;77:314–20.
58. Aleman L, Lavandero S. Autofagia en el sistema cardiovascular : pasado , presente y futuro. *Rev Chil Cardiol.* 2016;35:228–41.
59. Zavala UC, Florenzano UF. Diabetes y corazón. *Rev Clínica Las Condes* [Internet]. 2015;26(2):175–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rmclc.2015.04.006>
60. Baynes JW, Dominiczak M. *Bioquímica Médica.* 4th ed. Barcelona; 2014.
61. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell.* 6th ed. Vol. 53, *Journal of Chemical Information and Modeling.* New York: Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, an informa business; 2015. 1689–1699 p.

62. Badadani M. Autophagy mechanism, regulation, functions , and disorders. *ISRN Cell Biol.* 2012;2012(2):11.
63. Elinos CM, Maldonado V, Meléndez J. Caspasas: moléculas inductoras de apoptosis. *Gac Med Mex.* 2003;139:493–9.
64. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16(1):3–11.
65. O'Donovan NO, Crown J, Stunell H, Hill ADK, Mcdermott E, Higgins NO, et al. Caspase 3 in Breast Cancer. Vol. 9. Dublin; 2003.
66. Behzadi P, Ranjbar R. Caspases and apoptosis. *Mol Enzymol Drug Targets.* 2015;1(2):1–4.
67. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell death in the pathogenesis of heart disease: Mechanisms and significance. *Annu Rev Physiol.* 2009;72:19–44.
68. Ramírez MÁ, Márquez H, Barranco G, López J. Bcl-2: su papel en el ciclo celular, apoptosis y cáncer. *El Resid.* 2014;9(3):84–94.
69. Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther.* 2001;92:57–70.
70. Angosto MC. Bases moleculares de la apoptosis. *An Real Acad Farm.* 2003;69(1):43–70.
71. Chen Y, Hua Y, Li X, Arslan IM, Zhang W, Meng G. Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy. *Front Pharmacol.* 2020;11:1–9.
72. Luna A, López N, González V, Triana F, Königsberg M. El fantástico mundo de la proteína Bcl-2. *Rev Educ Bioquímica.* 2008;27(3):93–102.
73. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2014;15(1):49–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3722>
74. Ohsumi Y. Molecular mechanism of autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 1999;354(1389):1577–81.
75. Mariño G, López-Otín C. Autophagy: Molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61(12):1439–54.
76. Lavandero S, Rothermel BA, Hill JA, Lavandero S, Chiong M, Rothermel BA, et al. Autophagy in cardiovascular biology. *J Clin Invest.* 2015;125(1):55–64.
77. Johanna M, Sanctis B De. Autofagia y respuesta inmunitaria. *Investig Clínica.* 2013;54(3):325–37.
78. Yang YP, Liang ZQ, Gu ZL, Qin ZH. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin.* 2005;26(12):1421–34.
79. Allen EA, Baehrecke EH. Autophagy in animal development. *Cell Death Differ.* 2020;27(3):903–18.
80. Yang Z, Klionsky DJ. An overview of the molecular mechanism of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2009;335:1–32. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-3-642-00302-8>
81. Kobayashi S, Liang Q. Autophagy and mitophagy in diabetic cardiomyopathy. *BBA - Mol Basis Dis* [Internet]. 2014;1852(2):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.020>
82. Kubli DA, Gustafsson ÅB. Unbreak My Heart: Targeting mitochondrial autophagy in diabetic cardiomyopathy. *Antioxidants Redox Signal.* 2015;22(17):1527–44.
83. Wu J, Xing C, Zhang L, Mao H, Chen X. Autophagy promotes fibrosis and apoptosis in the peritoneum during long-term peritoneal dialysis. *J Cell Mol Med.* 2017;20(10):1–12.
84. Valente G, Morani F, Nicotra G, Fusco N, Peracchio C, Titone R, et al. Expression and

- clinical significance of the autophagy proteins BECLIN 1 and LC3 in ovarian cancer. *Biomed Res Int*. 2014;2014:1–10.
85. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, James Kang Y. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: Mitochondrial cytochrome c-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes*. 2002;51(6):1938–48.
 86. Engel D, Peshock R, Armstrong RC, Sivasubramanian N, Mann DL. Cardiac myocyte apoptosis provokes adverse cardiac remodeling in transgenic mice with targeted TNF overexpression. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2004;287:1303–11.
 87. Rodríguez MA, Méndez MA. El Proteosoma, sus Inhibidores y Toxicidad Cardíaca. *Rev Clínica la Esc Med UCR – HSJD*. 2018;8(2):11–21.
 88. Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol*. 2003;3(3):219–28.
 89. Marín-García J, Goldenthal MJ. La mitocondria y el corazón. *Rev Española Cardiol*. 2002;55(12):1293–310.
 90. Cao Y, Klionsky DJ. Physiological functions of Atg6 / Beclin 1 : a unique autophagy-related protein. *Cell Res*. 2007;17:839–49.
 91. Tatagiba W, Curi R, Alba T. Autophagy is impaired in neutrophils from streptozotocin-induced diabetic rats. *Front Immunol*. 2017;8(JAN):10–2.
 92. Hamacher-Brady A, Brady NR, Gottlieb RA, Gustafsson ÅB. Autophagy as a protective response to Bnip3-mediated apoptotic signaling in the heart. *Autophagy*. 2006;2(4):307–9.
 93. Kang PM, Izumo S. Apoptosis and heart failure. *Circ Res*. 2000;86:1107–13.
 94. Figueroa, Consuelo; Pérez, Ismael; Mejía R. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Rev MVZ Córdoba*. 2013;18:3699–707.
 95. Abdel-Hamid AAM, Firgany AEDL. Atorvastatin alleviates experimental diabetic cardiomyopathy by suppressing apoptosis and oxidative stress. *J Mol Histol*. 2015;46(4–5):337–45.
 96. Feidantsis K, Mellidis K, Galatou E, Sinakos Z, Lazou A. Treatment with crocin improves cardiac dysfunction by normalizing autophagy and inhibiting apoptosis in STZ-induced diabetic cardiomyopathy. *Nutr Metab Cardiovasc Dis [Internet]*. 2018;28(9):952–61. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2018.06.005>
 97. Wu B, Lin J, Luo J, Han D, Fan M, Guo T, et al. Dihydromyricetin Protects against Diabetic Cardiomyopathy in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1–13.
 98. Chen XY, Lv RJ, Zhang W, Yan YG, Li P, Dong WQ, et al. Inhibition of myocyte-specific enhancer factor 2A improved diabetic cardiac fibrosis partially by regulating endothelial-to-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2016;7(21):31053–66.
 99. Al-Damry NT, Attia HA, Al-Rasheed NM, Al-Rasheed NM, Mohamad RA, Al-Amin MA, et al. Sitagliptin attenuates myocardial apoptosis via activating LKB-1/AMPK/Akt pathway and suppressing the activity of GSK-3 β and p38 α /MAPK in a rat model of diabetic cardiomyopathy. *Biomed Pharmacother [Internet]*. 2018;107:347–58. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.126>
 100. Zheng W, Li D, Gao X, Zhang W, Robinson BO. Carvedilol alleviates diabetic cardiomyopathy in diabetic rats. *Exp Ther Med*. 2019;17(1):479–87.
 101. Xie Z, Lau K, Eby B, Lozano P, He C, Pennington B, et al. Improvement of cardiac functions by chronic metformin treatment is associated with enhanced cardiac autophagy in diabetic OVE26 mice. *Diabetes*. 2011;60(6):1770–8.
 102. Li C ling, Liu B, Wang Z yang, Xie F, Qiao W, Cheng J, et al. Salvianolic acid B improves myocardial function in diabetic cardiomyopathy by suppressing IGF1R. *J Mol Cell Cardiol [Internet]*. 2020;139(107):98–112. Available from:

- <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2020.01.009>
103. Wang X tao, Gong Y, Zhou B, Yang J jie, Cheng Y, Zhao J guo, et al. Ursolic acid ameliorates oxidative stress, inflammation and fibrosis in diabetic cardiomyopathy rats. *Biomed Pharmacother* [Internet]. 2018;97:1461–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.032>
 104. Ramírez-Silva S. Criterios de selección para animales de laboratorio: una guía práctica para investigadores. *Rev Sanid Milit*. 2017;56(1):46–52.
 105. Al-Awar A, Kupai K, Veszeka M, Szucs G, Attieh Z, Murlasits Z, et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. *J Diabetes Res*. 2016;2016:1–13.
 106. Mora Á, Aragón D, Ospina L. Características del estrés oxidativo en ratas Wister diabéticas por estresptozotocina. *Vitae*. 2009;16(3):311–9.
 107. Jia X, Xiao C, Sheng D, Yang M, Cheng Q, Wu J, et al. TRPV4 mediates cardiac fibrosis via the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in diabetic rats. *Cardiovasc Toxicol* [Internet]. 2020;20(5):492–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12012-020-09572-8>
 108. Jin L, Zhang J, Deng Z, Liu J, Han W, Chen G, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate myocardial fibrosis in diabetic cardiomyopathy via the secretion of prostaglandin E2. *Stem Cell Res Ther*. 2020;11:1–13.
 109. Liang E, Liu X, Du Z, Yang R, Zhao Y. Andrographolide ameliorates diabetic cardiomyopathy in mice by blockage of oxidative damage and NF- κ B-mediated inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2018;2018:1–13.
 110. Guo R, Hua Y, Rogers O, Brown TE, Ren J, Nair S. Cathepsin K knockout protects against cardiac dysfunction in diabetic mice. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09037-z>
 111. Zhao YZ, Zhang M, Tian XQ, Zheng L, Lu CT. Using basic fibroblast growth factor nanoliposome combined with ultrasound-introduced technology to early intervene the diabetic cardiomyopathy. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:675–86.
 112. Zhang L, Ding W yuan, Wang Z hao, Tang M xiong, Wang F, Li Y, et al. Early administration of trimetazidine attenuates diabetic cardiomyopathy in rats by alleviating fibrosis, reducing apoptosis and enhancing autophagy. *J Transl Med*. 2016;14(1):1–12.
 113. Filardi T, Ghinassi B, Di Baldassarre A, Tanzilli G, Morano S, Lenzi A, et al. Cardiomyopathy associated with diabetes: The central role of the cardiomyocyte. *Int J Mol Sci*. 2019;20(13).
 114. Tate M, Deo M, Cao AH, Hood SG, Huynh K, Kiriazis H, et al. Insulin replacement limits progression of diabetic cardiomyopathy in the low-dose streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetes Vasc Dis Res*. 2017;14(5):423–33.
 115. Zhao Y, Zhang L, Qiao Y, Zhou X, Wu G, Wang L, et al. Heme Oxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in Streptozotocin-Diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy. *PLoS One*. 2013;8(9):1–12.
 116. He C, Zhu H, Li H, Zou MH, Xie Z. Dissociation of Bcl-2-Beclin1 complex by activated AMPK enhances cardiac autophagy and protects against cardiomyocyte apoptosis in diabetes. *Diabetes*. 2013;62(4):1270–81.
 117. Li CJ, Zhang QM, Li MZ, Zhang JY, Yu P, Yu DM. Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy. *Chin Med J (Engl)*. 2009;122(21):2580–6.
 118. Wang C, Wang X. The interplay between autophagy and the ubiquitin-proteasome system in cardiac proteotoxicity. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2015;1852(2):188–94.
 119. Ouyang C, You J, Xie Z. The interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic

- heart. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2014;71:71–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.10.014>
120. Sciarretta S, Boppana VS, Umapathi M, Frati G, Sadoshima J. Boosting autophagy in the diabetic heart: a translational perspective. *Cardiovasc Diagn Ther*. 2015;5(5):394–402.
 121. Delbridge LMD, Mellor KM, Taylor DJ, Gottlieb RA. Myocardial stress and autophagy: Mechanisms and potential therapies. *Nat Rev Cardiol* [Internet]. 2017;14(7):412–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.35>
 122. Mellor KM, Bell JR, Young MJ, Ritchie RH, Delbridge LMD. Myocardial autophagy activation and suppressed survival signaling is associated with insulin resistance in fructose-fed mice. *J Mol Cell Cardiol* [Internet]. 2011;50(6):1035–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.03.002>
 123. Wu A, Hu P, Lin J, Xia W, Zhang R. Activating cannabinoid receptor 2 protects against diabetic cardiomyopathy through autophagy induction. *Front Pharmacol*. 2018;9:1–10.
 124. Yuan X, Xiao YC, Zhang GP, Hou N, Wu XQ, Chen WL, et al. Chloroquine improves left ventricle diastolic function in streptozotocin-induced diabetic mice. *Drug Des Devel Ther*. 2016;10:2729–37.
 125. Wang G, Bi Y, Liu X, Zhao Y, Han J, Wei M. Autophagy was involved in the protective effect of metformin on hyperglycemia-induced cardiomyocyte apoptosis and Connexin43 downregulation in H9c2 cells. *Int J Med Sci*. 2017;14.
 126. Nguyen D, Nguyen D. Quantifying chromogen intensity in immunohistochemistry via reciprocal intensity. *Protoc Exch*. 2013;1–7.
 127. Malek V, Gaikwad AB. Telmisartan and thiorphan combination treatment attenuates fibrosis and apoptosis in preventing diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2019;115(2):373–84.
 128. Lee TI, Bai KJ, Chen YC, Lee TW, Chung CC, Tsai WC, et al. Histone deacetylase inhibition of cardiac autophagy in rats on a high-fat diet with low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes mellitus. *Mol Med Rep*. 2018;17(1):594–601.

ANEXOS

ANEXO 1

Carta de aprobación proyecto del Dr. Rienzi Díaz

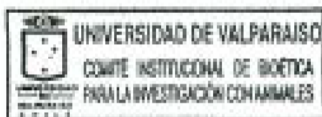
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA072-16

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 05 de enero de 2018, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA072-16 titulado "MUERTE CELULAR Y FIBROSIS EN MIOCARDIO DE RATAS CON DIABETES MELLITUS EXPERIMENTALMENTE INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA", del investigador responsable Dr. Rienzi Díaz, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.



Edda Meléndez Pinto
Vicepresidenta

Comité Institucional de Bioética para Investigación la Investigación con Animales de Experimentación (CIBICA)

Valparaíso 05 de enero de 2018

Blanco 951, Valparaíso | Fono-Fax: +56 (32) 2603184 |
www.uv.cl

ANEXO 2

PROTOCOLO PARA TÉCNICA HISTOQUÍMICA: TRICRÓMICO DE MASSON

Soluciones

a) Fijador de Bouin

- Ácido pícrico saturado..... 150 ml
- Formaldehído..... 50 ml
- Ácido acético glacial..... 10 ml

b) Solución de Biebrich Scarlet

- Biebrich Scarlet 0.9 g
- Fucsina ácida 0.1 g
- Agua destilada..... 100 ml
- Ácido acético glacial..... 1 ml

c) Hematoxilina de Weigert

d) Solución de ácido fosfotúngstico-fosfomolibdico

- Ácido fosfotúngstico..... 2.5 g
- Ácido fosfomolibdico..... 2.5 g
- Agua destilada..... 100 ml

e) Solución de Azul anilina

- Azul anilina 2.5 g
- Agua destilada..... 100 ml
- Ácido acético glacial..... 1ml

f) Ácido acético 1%

Procedimiento

1.- Desparafinar e hidratar según protocolo del Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso.

Desparafinar

- a) xilol x 5 minutos
- b) xilol x 5 minutos
- c) xilol x 5 minutos

Rehidratación

- d) alcohol 100° x 5 minutos
- e) alcohol 100° x 5 minutos
- f) alcohol 95° x 5 minutos
- g) alcoholes 70° x 5 minutos

- 2.- Lavado en agua destilada x 5 minutos.
- 3.- Mordentar cortes en solución de Bouin por 1 hora a 60°C (en un coplin de vidrio dentro de la estufa).
- 4.- Lavar en agua corriente hasta eliminar la coloración amarilla de los cortes (5 minutos aproximadamente).
- 5.- Sumergir cortes en Hematoxilina de Weigert por 4 minutos.
- 6.- Virar en agua corriente.
- 7.- Lavar en agua destilada.
- 8.- Teñir con solución de Biebrich Scarlet por 1 minuto y medio (control al microscopio).
- 9.-Lavar en agua corriente.
- 10.- Teñir en ácido fosfotungstico- ácido fosfomolibdico por 15 minutos.
- 11.- Teñir en solución de azul de anilina por 8 minutos.
- 12.- Sumergir en solución de ácido acético al 1% por 3 minutos.
- 13.-Deshidratar, aclarar y cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 3

PROTOCOLO TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA CASPASA 3 ACTIVADA (ab2302)

Cortes de 5 micras en placas con polilisina doble.

Secado 1 hora en estufa 60°C.

Almacenamiento a 4° refrigerador.

Procedimientos

1. Desparafinar e hidratar según protocolo del Laboratorio de Ciencias Morfológicas.

Desparafinar

- a) xilol x 5 minutos
- b) xilol x 5 minutos
- c) xilol x 5 minutos

Rehidratación

- d) alcohol 100° x 5 minutos
- e) alcohol 100° x 5 minutos
- f) alcohol 95° x 5 minutos
- g) alcoholes 70° x 5 minutos

2. Lavado en agua destilada x 5 minutos.

3. Recuperación antigénica:

Buffer citrato 95° por 15 minutos.

- a. Dejar enfriar en el buffer por 15 minutos.
- b. Lavar en agua destilada por 8 minutos.

4. Realizar 3 cambios x 5 minutos de PBS 1 X.

5. Bloqueo peroxidasa al 3% en PBS por 30 minutos.

6. Realizar 3 lavados de PBS 1X x 5 minutos.

7. Bloqueo de sitios inespecíficos:

- a. Aplicar Cas-Block durante 30 minutos a TA.
- b. Incubación con suero de cabra al 5% durante 30 minutos a TA.

8. Incubación del anticuerpo primario:

Anti-caspasa 3 activada diluido 1:250 en PBS/Tween 20 durante la noche a 4°C.

9. Realizar 3 Cambios en PBS 1X, 5 minutos cada uno.

10. Incubación de anticuerpo secundario

Anti conejo hecho en cabra, conjugado con HPR, diluido 1:1000 en PBS, durante 1 hora a TA.

11. Realizar 3 cambios en PBS 1X, 5 minutos cada uno.

12. Revelado cromogénico con Nova Red - Kit, durante 3:30 minutos (controlar en microscopio).

Según sea el número de cortes se debe elegir el volumen necesario para trabajar con el kit de revelado, considerando 50 uL de volumen final para cada corte.

Agua destilada	Botella 1	Botella 2	Botella 3	H₂O₂
2.5 ml	75ul	50ml	50ml	50ml
1.25 ml	38ml	25ml	25ml	25ml
625ul	19ul	12.5ul	12.5ul	12.5ul
313ul	9.5ul	6.25ul	6.25ul	6.25ul

13. Lavar en agua destilada durante 5 minutos.
14. Contraste Nuclear:
 - a. Teñir brevemente con Hematoxilina (2 segundos).
 - b. Virar hematoxilina en agua corriente durante 5 minutos.
15. Deshidratación
 - a. Alcohol 95% (dipping).
 - b. Alcohol 100% (dipping).
 - c. Alcohol 100% (dipping).
 - d. Alcohol/xilol (dipping).
16. Aclaramiento
 - a. xilol 5 minutos.
 - b. xilol 5 minutos.
17. Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

ANEXO 4

PROTOCOLO TÉCNICA INMUNOHISTOQUÍMICA BECLIN-1 (ab62557)

Cortes de 5 micras en placas con polilisina doble.

Secado 1 hora en estufa 60°C.

Almacenamiento a 4° refrigerador.

Procedimientos

1.- Desparafinar e hidratar según protocolo del laboratorio de Ciencias Morfológicas

Desparafinar

- a) xilol x 5 minutos.
- b) xilol x 5 minutos.
- c) xilol x 5 minutos.

Rehidratación

- d) alcohol 100° x 5 minutos.
- e) alcohol 100° x 5 minutos.
- f) alcohol 95° x 5 minutos.
- g) alcoholes 70° x 5 minutos.

2.- Lavado en agua destilada x 5 minutos.

3.- Recuperación antigénica:

- A. Buffer citrato 95° por 15 minutos.
- B. Dejar enfriar en el buffer por 15 minutos.
- C. Lavar en agua destilada por 8 minutos.

4.- Realizar 3 cambios x 5 minutos de PBS 1 X.

5.- Bloqueo peroxidasa al 3% en PBS por 30 minutos.

6.- Realizar 3 lavados de PBS 1X x 5 minutos.

7.- Bloqueo de sitios inespecíficos:

- A. Aplicar Cas-Block durante 30 minutos a TA.
- B. Incubación con suero de cabra al 5% durante 30 minutos a TA.

8.- Incubación del anticuerpo primario:

Anti-Beclin 1 diluido 1:250 en PBS/Tween 20 durante la noche a 4°C.

9.- Realizar 3 Cambios en PBS 1X, 5 minutos cada uno.

10.- Incubación de anticuerpo secundario

Anti conejo hecho en cabra, conjugado con HPR, diluido 1:1000 en PBS, durante 1 hora a TA

11.- Realizar 3 cambios en PBS 1X, 5 min cada uno.

12.- Revelado cromogénico con Nova Red - Kit, durante 3:30 minutos (controlar en microscopio). Según sea el número de cortes se debe elegir el volumen necesario para trabajar con el kit de revelado, considerando 50 uL de volumen final para cada corte.

Agua destilada	Botella 1	Botella 2	Botella 3	H₂O₂
-----------------------	------------------	------------------	------------------	-----------------------------------

2.5 ml	75ul	50ml	50ml	50ml
1.25 ml	38ml	25ml	25ml	25ml
625ul	19ul	12.5ul	12.5ul	12.5ul
313ul	9.5ul	6.25ul	6.25ul	6.25ul

13.- Lavar en agua destilada durante 5 minutos.

14.- Contraste Nuclear:

A. Teñir brevemente con Hematoxilina (2 segundos).

B. Virar hematoxilina en agua corriente durante 5 minutos.

15.- Deshidratación:

A. Alcohol 95% (dipping)

B. Alcohol 100% (dipping)

C. Alcohol 100% (dipping)

D. Alcohol/xilol (dipping)

16.- Aclaramiento

A. xilol 5 minutos.

B. xilol 5 minutos.

17.- Cubrir con medio de montaje hidrófobo.

